(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106279416 B
(45)授权公告日 2019.08.30

(21)申请号 201610635184.8
(22)申请日 2011.03.01
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106279416 A
(43)申请公布日 2017.01.04
(30)优先权数据
61/310,695 2010.03.04 US
61/310,692 2010.03.04 US
61/311,057 2010.03.05 US
(62)分案原申请数据
201180022024.1 2011.03.01
(73)专利权人 宏观基因有限公司
地址 美国马里兰州
(72)发明人 德瑞克·T·卢 菱·黄
保罗·A·摩尔
弗朗辛·志芬·陈
莱斯利·S·约翰逊
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
代理人 郝文博 王建秀
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
(56)对比文件
US 2009087416 A1,2009.04.02,
WO 2006113665 A2,2006.10.26,
WO 2008066691 A2,2008.06.05,
审查员 马静

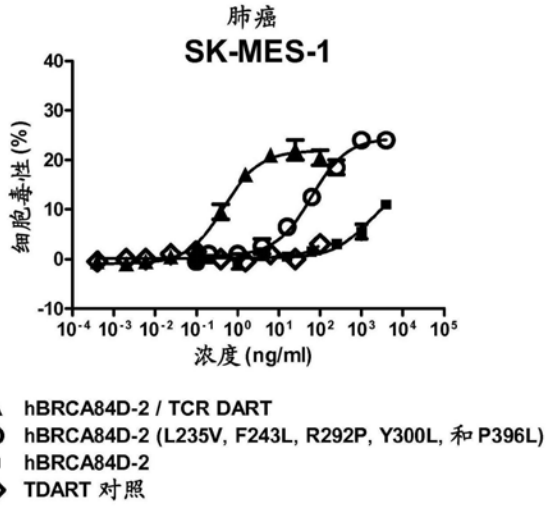
权利要求书3页 说明书101页
序列表69页 附图41页

(54)发明名称

与B7-H3反应性的抗体、其免疫学活性片段及其用途

(57)摘要

本发明涉及对哺乳动物，且更特别地对人B7-H3受体具有免疫反应性的抗体及其片段，且涉及其用途，特别是在治疗癌症和炎症中的用途。因此本发明特别地涉及能够介导，且更优选地能够加强活化针对与多种人类癌症有关的癌细胞的免疫系统的人源化B7-H3-反应性抗体及其免疫反应性片段。



CN 106279416 B

1.一种双亲和再靶向试剂,所述试剂包含:

(A)多肽链I,所述多肽链I包含特异性结合B7-H3的免疫球蛋白VL表位结合结构域和特异性结合不同于B7-H3的分子的VH表位结合结构域;和

(B)多肽链II,所述多肽链II包含特异性结合B7-H3的免疫球蛋白VH表位结合结构域,和特异性结合所述不同于B7-H3的分子的VL表位结合结构域;

其中所述多肽链I和多肽链II结合在一起以形成能够结合B7-H3和所述不同于B7-H3的分子的功能性表位结合结构域;和

其中能够结合B7-H3的所述表位结合结构域结合B7-H3的4Ig和2Ig同种型,和其中:

(1)特异性结合B7-H3的所述VL表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3,和特异性结合B7-H3的所述VH表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;或

(2)特异性结合B7-H3的所述VL表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3,和特异性结合B7-H3的所述VH表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;或

(3)特异性结合B7-H3的所述VL表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3,和特异性结合B7-H3的所述VH表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

2.根据权利要求1所述的双亲和再靶向试剂,其中特异性结合B7-H3的所述VL表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3,和特异性结合B7-H3的所述VH表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

3.根据权利要求1所述的双亲和再靶向试剂,其中特异性结合B7-H3的所述VL表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3,和特异性结合B7-H3的所述VH表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

4.根据权利要求1所述的双亲和再靶向试剂,其中特异性结合B7-H3的所述VL表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3,和特异性结合B7-H3的所述VH表位结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

5.根据权利要求1所述的双亲和再靶向试剂,其中:

(A)所述多肽链I包含轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;和

(B)所述多肽链II包含重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

6.根据权利要求1所述的双亲和再靶向试剂,其中所述试剂包含至少一部分Fc结构域。

7.根据权利要求1所述的双亲和再靶向试剂,其中:

(A)所述多肽链I另外包含E-卷曲结构域和所述多肽链II另外包含K-卷曲结构域;或

(B)所述多肽链I另外包含K-卷曲结构域和所述多肽链II另外包含E-卷曲结构域。

8.根据权利要求7所述的双亲和再靶向试剂，其中所述试剂包含至少一部分Fc结构域。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的双亲和再靶向试剂，其中可被所述试剂结合的所述不同于B7-H3的分子是半抗原。

10.根据权利要求9所述的双亲和再靶向试剂，其中所述半抗原是异硫氰酸荧光素。

11.根据权利要求1-8中任一项所述的双亲和再靶向试剂，其中可被所述试剂结合的所述不同于B7-H3的分子是T-细胞受体、T-细胞共受体或NKG2D受体。

12.根据权利要求1-8中任一项所述的双亲和再靶向试剂，其中可被所述试剂结合的所述不同于B7-H3的分子是肿瘤相关抗原。

13.根据权利要求12所述的双亲和再靶向试剂，其中所述肿瘤相关抗原选自由以下组成的组：A33；ADAM-9；ALCAM；BAGE；β-连环蛋白；CA125；羧肽酶M；CD103；CD19；CD20；CD22；CD23；CD25；CD27；CD28；CD36；CD40/CD154；CD45；CD46；CD5；CD56；CD79a/CD79b；CDK4；CEA；CTLA4；细胞角蛋白8；EGF-R；EphA2；ErbB1；ErbB3；ErbB4；GAGE-1；GAGE-2；GD2/GD3/GM2；gp100；HER-2/neu；人乳头瘤病毒-E6；人乳头瘤病毒-E7；整联蛋白α-V-β-6；JAM-3；KID3；KID31；KSA(17-1A)；LUCA-2；MAGE-1；MAGE-3；MART；MUC-1；MUM-1；N-乙酰葡糖胺转移酶；制癌蛋白M；p15；PIPA；PSA；PSMA；ROR1；sTn；TNF-β受体；TNF-α受体；TNF-γ受体；转铁蛋白受体；和VEGF受体。

14.一种编码权利要求1-13中任一项所述的双亲和再靶向试剂的多肽链的核酸分子。

15.一种药物组合物，其包含(i)治疗有效量的权利要求1-13中任一项所述的双亲和再靶向试剂和(ii)药学上可接受的载体。

16.根据权利要求15所述的药物组合物，其进一步包含一种或多种另外的抗癌剂。

17.根据权利要求16所述的药物组合物，其中所述另外的抗癌剂是化疗剂、放射治疗剂、激素治疗剂、毒素或免疫治疗剂。

18.根据权利要求17所述的药物组合物，其中所述另外的抗癌剂是选自由以下组成的组的毒素：紫杉烷、美登木素生物碱、阿里他汀、卡奇霉素、蒽环霉素、CC-1065类似物、多西他赛、组织蛋白酶、蓖麻毒素、多花白树毒蛋白、假单胞菌外毒素、白喉毒素、RNA酶和毒性放射性同位素。

19.根据权利要求1-13中任一项所述的双亲和再靶向试剂或权利要求15-18中任一项所述的药物组合物在制备用于诊断癌症的试剂盒中的用途，其中所述双亲和再靶向试剂被可检测地标记。

20.根据权利要求19所述的用途，其中所述癌症选自由以下组成的组：肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性发育不良、胆囊或胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、白血病、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤性肿瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、肾转移性癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、滑膜

肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌。

21.根据权利要求1-13中任一项所述的双亲和再靶向试剂或权利要求15-18中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗患者中的癌症的药物中的用途。

22.根据权利要求21所述的用途，其中所述癌症选自由以下组成的组：肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性发育不良、胆囊或胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、白血病、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤性肿瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、肾转移性癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌。

与B7-H3反应性的抗体、其免疫学活性片段及其用途

[0001] 本申请是PCT申请号为PCT/US2011/026689,发明名称为“与B7-H3反应性的抗体、其免疫学活性片段及其用途”的PCT申请进入中国国家阶段后申请号为201180022024.1的中国国家阶段申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用:

[0003] 本申请要求美国专利申请序列号为61/310,692(2010年3月4日递交;待决);61/310,695(2010年3月4日递交;待决);61/311,057(2010年3月5日递交;待决)的优先权,这些申请中的每一个被通过引用全部并入本文。

[0004] 序列表的引用:

[0005] 依据37C.F.R.1.821et seq.,本申请包括一份或多份序列表,这些序列表在纸件和计算机可读介质中公开,且这些纸件和计算机可读的公开内容被通过引用全部并入本文。

[0006] 发明背景:

发明领域:

[0007] 本发明涉及对哺乳动物,且更特别地对人B7-H3受体具有免疫反应性的抗体及其片段,且涉及其用途,特别是在治疗癌症和炎症中的用途。因此本发明特别地涉及能够介导,且更优选地能够加强活化针对与多种人类癌症有关的癌细胞的免疫系统的人源化B7-H3-反应性抗体及其免疫反应性片段。

[0008] 相关技术说明

[0009] 肿瘤的生长和转移在很大程度上取决于其逃避宿主免疫监视并战胜宿主防御的能力。虽然大部分肿瘤表达可在不同程度上被宿主免疫系统识别的抗原,但是在许多情况下,由于效应T细胞的低效活化而引发不充分的免疫反应(Khawli,L.A.等人(2008)“Cytokine,Chemokine,and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors,”Exper.Pharmacol.181:291-328)。

[0010] CD4+T-淋巴细胞是大多数哺乳动物免疫反应和自身免疫反应的主要组织者(Dong,C.等人(2003)“Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,”Immunolog.Res.28(1):39-48)。已发现通过抗原递呈细胞与幼稚CD4+T-淋巴细胞之间的共刺激相互作用介导CD4+辅助性T-细胞的活化。需要两种相互作用(Viglietta,V.等人(2007)“Modulating Co-Stimulation,”Neurotherapeutics 4:666-675;Korman,A.J.等人(2007)“Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,”Adv.Immunol.90:297-339)。在第一种相互作用中,抗原递呈细胞必须展示结合至细胞主要组织相容性复合物,使得其可结合幼稚CD4+T-淋巴细胞的T-细胞受体(“TCR”)。在第二种相互作用中,抗原递呈细胞的配体必须结合CD4+T-淋巴细胞的CD28受体(Dong,C.等人(2003)“Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,”Immunolog.Res.28(1):39-48;Lindley,P.S.等人(2009)“The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,”Immunol.Rev.229:307-321)。然后经历两种刺激信号的CD4辅助性T-细胞能够响应于细胞

因子(例如白介素-2和白介素-12)以发育成Th1细胞。这些细胞产生介导对表达靶抗原的靶细胞的炎症反应的干扰素-γ(IFN-γ)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)。还发生B-细胞活化和增殖,导致靶抗原特异性抗体的产生(Bernard,A.等人(2005)“T and B Cell Cooperation:A Dance of Life and Death,”Transplantation 79:S8-S11)。TCR衔接期间,在无两种共刺激信号存在下,T细胞进入称为克隆无反应性的功能上无响应状态(Khawli,L.A.等人(2008)“Cytokine,Chemokine,and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors,”Exper.Pharmacol.181:291-328)。在病理状态下,Th1细胞是多种器官特异性自身免疫疾病,例如I型糖尿病、风湿性关节炎和多发性硬化的关键参与者(Dong,C.等人(2003)“Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,”Immunolog.Res.28(1):39-48)。

[0011] I.B7超家族和B7-H3

[0012] 对CD28受体的配体的研究已促成对称为B7超家族的一组相关分子的表征(Coyle,A.J.等人(2001)“The Expanding B7Superfamily:Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function,”Nature Immunol.2(3):203-209;Sharpe,A.H.等人(2002)“The B7-CD28Superfamily,”Nature Rev.Immunol.2:116-126;Greenwald,R.J.等人(2005)“The B7Family Revisited,”Ann.Rev.Immunol.23:515-548;Collins,M.等人(2005)“The B7Family Of Immune-Regulatory Ligands,”Genome Biol.6:223.1-223.7;Loke,P.等人(2004)“Emerging Mechanisms Of Immune Regulation:The Extended B7Family And Regulatory T Cells.”Arthritis Res.Ther.6:208-214;Korman,A.J.等人(2007)“Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,”Adv.Immunol.90:297-339;Flies,D.B.等人(2007)“The New B7s:Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,”J.Immunother.30(3):251-260;Agarwal,A.等人(2008)“The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,”Curr.Opin.Organ Transplant.13:366-372;Lenschow,D.J.等人(1996)“CD28/B7System of T Cell Costimulation,”Ann.Rev.Immunol.14:233-258;Wang,S.等人(2004)“Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,”Microbes Infect.6:759-766)。目前存在七种已知的该家族的成员:B7.1(CD80)、B7.2(CD86)、可诱导的共刺激因子的配体(ICOS-L)、程序性死亡-1配体(PD-L1)、程序性死亡-2配体(PD-L2)、B7-H3和B7-H4(Collins,M.等人(2005)“The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,”Genome Biol.6:223.1-223.7)。

[0013] B7家族成员是具有免疫球蛋白-V样结构域和免疫球蛋白-C样结构域(例如,IgV-IgC)的免疫球蛋白超家族成员(Sharpe,A.H.等人(2002)“The B7-CD28Superfamily,”Nature Rev.Immunol.2:116-126)。B7家族成员的IgV和IgC结构域各自由单一外显子编码,另外的外显子编码前导序列、跨膜结构域和胞质结构域。胞质结构域是短的,长度在19至62个氨基酸残基范围内且可由多个外显子编码(Collins,M.等人(2005)“The B7Family Of Immune-Regulatory Ligands,”Genome Biol.6:223.1-223.7)。B7-H3的独特之处在于其主要人类形式包含两个细胞外串联的IgV-IgC结构域(即,IgV-IgC-IgV-IgC)(Collins,M.等人(2005)“The B7Family Of Immune-Regulatory Ligands,”Genome Biol.6:223.1-

223.7)。B7家族的成员被预测为在细胞表面形成背靠背、非共价的同二聚体,且已发现这些二聚体与B7-1(CD80)和B7-2(CD86)有关。

[0014] B7-1(CD80)和B7-2(CD86)显示出具有对刺激性CD28受体和抑制性CTLA-4(CD152)受体的双特异性(Sharpe,A.H.等人(2002)“The B7-CD28Superfamily,”Nature Rev.Immunol.2:116-126)。

[0015] 虽然最初认为仅包含2个Ig结构域(IgV-IgC)(Chapoval,A.等人(2001)“B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γProduction,”Nature Immunol.2:269-274;Sun,M.等人(2002)“Characterization of Mouse and Human B7-H3Genes,”J.Immunol.168:6294-6297),已鉴定到四个免疫球蛋白胞外域的变体(“4Ig-B7-H3”)并发现其是更常见的人蛋白质形式(Sharpe,A.H.等人(2002)“The B7-CD28Superfamily,”Nature Rev.Immunol.2:116-126)。因为天然的小鼠形式(2Ig)和人4Ig形式显示出相似的功能,未观察到这两种形式之间的功能差异(Hofmeyer,K.等人(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)105(30):10277-10278)。4Ig-B7-H3分子抑制自然杀伤细胞介导的癌细胞裂解(Castriconi,R.等人“Identification Of 4Ig-B7-H3As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)101(34):12640-12645)。已发现人B7-H3(2Ig形式)通过结合活化的T细胞上的推定受体促进T-细胞活化和IFN-γ产生(Chapoval,A.等人(2001)“B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γProduction,”Nature Immunol.2:269-274;Xu,H.等人(2009)“MicroRNA miR-29Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3:Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors,”Cancer Res.69(15):5275-6281)。B7-H4和B7-H1当表达在肿瘤细胞上时都是免疫功能的有效抑制剂(Flies,D.B.等人(2007)“The New B7s:Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,”J.Immunother.30(3):251-260)。

[0016] 当B7-H3介导T细胞共刺激和共抑制时,该蛋白质的作用方式是复杂的(Hofmeyer,K.等人(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)105(30):10277-10278;Martin-Orozco,N.等人(2007)“Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,”Semin.Cancer Biol.17(4):288-298;Subudhi,S.K.等人(2005)“The Balance Of Immune Responses:Costimulation Verse Coinhibition,”J.Mol.Med.83:193-202)。B7-H3结合(TREM)-样转录物2(TLT-2)并共刺激T细胞活化,而且结合至今仍未确认的受体来介导T细胞的共抑制。另外,通过与未知受体的相互作用,B7-H3成为自然杀伤细胞和成骨细胞的抑制因子(Hofmeyer,K.等人(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)105(30):10277-10278)。该抑制可通过与大多数信号通路的成员的相互作用进行,T细胞受体(TCR)通过这些信号通路调节基因转录(例如NFTA、NF-κB或AP-1因子)。

[0017] B7-H3共刺激CD4+和CD8+T-细胞的增殖。B7-H3还刺激IFN-γ产生和CD8+的裂解活性(Chapoval,A.等人(2001)“B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γProduction,”Nature Immunol.2:269-274;Sharpe,A.H.等人(2002)“The B7-CD28Superfamily,”Nature Rev.Immunol.2:116-126)。然而,该蛋白质还可能通过NFAT(用

于活化的T细胞的核因子)、NF-κB(核因子κB)和AP-1(激活蛋白-1)因子来抑制T细胞活化(Yi.K.H.等人(2009)“Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3And B7-H4,”Immunol.Rev.229:145-151)。B7-H3还被认为体内抑制Th1、Th2或Th17(Prasad,D.V.等人(2004)“Murine B7-H3Is A Negative Regulator Of T Cells,”J.Immunol.173:2500-2506;Fukushima,A.等人(2007)“B7-H3Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice,”Immunol.Lett.113:52-57;Yi.K.H.等人(2009)“Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3And B7-H4,”Immunol.Rev.229:145-151)。多个独立研究已表明人恶性肿瘤细胞在B7-H3蛋白表达方面表现出显著的增加且这种表达增加与疾病严重度的增加有关(Zang,X.等人(2007)“The B7Family And Cancer Therapy:Costimulation And Coinhibition,”Clin.Cancer Res.13:5271-5279),表明B7-H3被肿瘤作为免疫逃避通路利用(Hofmeyer,K.等人(2008)“The Contrasting Role Of B7-H3,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)105(30):10277-10278)。

[0018] 阻碍B7分子结合T-细胞受体(例如,CD28)的能力的分子抑制免疫系统且已被建议作为用于自身免疫疾病的治疗(Linsley,P.S.等人(2009)“The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Co-Stimulation,”Immunolog.Rev.229:307-321)。经抗4Ig-B7-H3抗体处理的表达4Ig-B7-H3的成神经细胞瘤细胞对NK细胞更敏感。然而,不清楚这种活性是否可归因于只针对4Ig-B7-H3形式的抗体,因为针对4Ig-B7-H3产生的所有已报道的抗体还结合两个Ig样形式的B7H3(Steinberger,P.等人(2004)“Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3,a Member of the B7Family with Four Ig-Like Domains,”J.Immunol.172(4):2352-2359和Castriconi等人(2004)“Identification Of 4Ig-B7-H3As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)101(34):12640-12645)。

[0019] 虽然B7-H3未表达在静息B或T细胞、单核细胞、或树突细胞上,但是其可通过IFN-γ在树突细胞上被诱导或通过GM-CSF在单核细胞上被诱导(Sharpe,A.H.等人(2002)“The B7-CD28Superfamily,”Nature Rev.Immunol.2:116-126)。结合B7-H3的受体未被充分表征。早期工作表明这样的一种受体将需要在活化后的T细胞上快速且短暂地上调(Loke,P.等人(2004)“Emerging Mechanisms Of Immune Regulation:The Extended B7Family And Regulatory T Cells.”Arthritis Res.Ther.6:208-214)。近来,已表明表达在骨髓细胞上的(TREM)-样转录物2(TLT-2或TREML2)受体(King,R.G.等人(2006)“Trem-Like Transcript 2Is Expressed On Cells Of The Myeloid/Granuloid And B Lymphoid Lineage And Is Up-Regulated In Response To Inflammation,”J.Immunol.176:6012-6021;Klesney-Tait,J.等人(2006)“The TREM Receptor Family And Signal Integration,”Nat.Immunol.7:1266-1273;Yi.K.H.等人(2009)“Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3And B7-H4,”Immunol.Rev.229:145-151)能够结合B7-H3且从而能够共刺激特别是CD8+T细胞的活化(Zang,X.等人(2003)“B7x:A Widely Expressed B7Family Member That Inhibits T Cell Activation,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)100:10388-10392;Hashiguchi,M.等人(2008)“Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cell-Like Transcript 2(TLT-2)Is A Counter-Receptor For B7-H3And

Enhances T Cell Responses,"Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)105(30):10495-10500;Hofmeyer,K.等人(2008)"The Contrasting Role Of B7-H3,"Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)105(30):10277-10278)。

[0020] 人B7-H3除了表达在成神经细胞瘤细胞上,还已知其表达在多种其他癌细胞(例如,胃癌、卵巢癌和非小细胞肺癌)上。已在肿瘤细胞系中通过免疫组织化学检测到B7-H3蛋白的表达(Chapoval,A.等人(2001)"B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production,"Nature Immunol.2:269-274;Saatian,B.等人(2004)"Expression Of Genes For B7-H3And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation,"Amer.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.287:L217-L225;Castriconi等人(2004)"Identification Of 4Ig-B7-H3As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis,"Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)101(34):12640-12645);Sun,M.等人(2002)"Characterization of Mouse and Human B7-H3Genes,"J.Immunol.168:6294-6297)。已在心脏、肾、睾丸、肺、肝、胰、前列腺、结肠和成骨细胞中发现mRNA的表达(Collins,M.等人(2005)"The B7Family Of Immune-Regulatory Ligands,"Genome Biol.6:223.1-223.7)。在蛋白质水平上,在人的肝、肺、膀胱、睾丸、前列腺、乳房、胎盘和淋巴器官中发现了B7-H3(Hofmeyer,K.等人(2008)"The Contrasting Role Of B7-H3,"Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)105(30):10277-10278)。

[0021] II.治疗性抗体

[0022] 除了其在诊断方面的已知用途,还表明抗体作为治疗剂是有用的。例如,近年来免疫治疗或抗体用于治疗性目的的用途已被用来治疗癌症。被动免疫治疗包括在癌症治疗中使用单克隆抗体(参见例如,DeVita,Hellman,and Rosenberg's Cancer:Principles&Practice of Oncology,Eighth Edition(2008),DeVita,V.等人编辑,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA,第537-547页,2979-2990)。这些抗体可能通过直接抑制肿瘤细胞生长或存活和通过其补充身体免疫系统的天然细胞的杀伤活性的能力而具备固有的治疗性生物活性。这些剂可单独施用或联合放射或化疗剂施用。分别被批准用于治疗非霍奇金淋巴瘤和乳腺癌的利妥昔单抗和曲妥珠单抗是这些治疗剂的实例。可选择地,抗体可用来制备抗体偶联物,其中抗体与毒剂连接并通过与肿瘤特异性结合将该剂导向肿瘤。吉妥珠单抗奥佐米星是被批准用于治疗白血病的抗体偶联物的实例。

[0023] 已公开了结合癌细胞并具有潜在的诊断和治疗用途的单克隆抗体(参见,例如,以下专利申请,其特别地公开了靶蛋白的大约分子量:美国专利第6,054,561号(200kD的c-erbB-2(Her2)和大小为40-200KD的其他未知抗原)和美国专利第5,656,444号(50kD和55kD的癌胚蛋白))。临床试验中和/或被批准用于治疗实体瘤的抗体的实例包括:曲妥珠单抗(抗原:180kD,HER2/neu)、依决洛单抗(抗原:40-50kD,Ep-CAM)、抗人奶脂肪球(HMFG1)(抗原>200kD,HMW黏蛋白)、西妥昔单抗(抗原:150kD和170kD,EGF受体)、阿仑单抗(抗原:21-28kD,CD52)、和利妥昔单抗(抗原:35kD,CD20)。

[0024] 用来治疗乳腺癌的曲妥珠单抗(Her-2受体)和在临床试验中用于治疗多种癌症的西妥昔单抗(EGF受体)的抗原靶以某种可检测水平存在于大量的正常人成体组织,包括皮肤、结肠、肺、卵巢、肝和胰中。使用这些治疗剂的安全边际可能由这些部位的抗原表达水平

或抗体的接近或活性的差异提供。

[0025] 另一种类型的免疫治疗是主动免疫治疗，或称疫苗接种，其利用存在于特定癌症上的抗原或指导抗原表达的DNA构建体，然后它们引起个体的免疫反应，即引发个体主动产生针对其自身癌症的抗体。主动免疫不像被动免疫治疗或免疫毒素那样经常使用。

[0026] 已指示了疾病(包括癌症)进展的多种模型。理论包括从由单一的感染/转化事件到越来越“疾病样”或“癌症样”的组织类型的演变，最终促成具有完全致病或恶化能力的一种组织类型。有人认为对于癌症，例如，单一的突变事件足以导致恶性，而其他人认为随后的变化也是必要的。一些人已提出通过细胞水平的一连串的突变-选择事件，越来越高的突变负荷和肿瘤等级对于肿瘤形成的引发以及进展是必要的。某些癌症靶仅发现于肿瘤组织中，而其他的靶存在于正常组织中并在肿瘤组织中被上调和/或过表达。在这些情况下，某些研究者已提出过表达与恶性的获得有关，而其他人提出过表达仅是向越来越病态的途径发展趋势的标志。

[0027] 已表明在某些情况下，癌症靶例如肿瘤中表达或过表达的癌蛋白质存在于胚胎和胎儿发育期间并用作生长和分化的调节剂。某些研究者已发现这些癌蛋白质在胚胎和胎儿发育期间的表达呈现出局限于特定组织且也局限于特定的发育阶段。相比而言，已表明这些癌蛋白质在成体中的表达与在肿瘤生长中的过表达和/或肿瘤抑制蛋白质的功能失常有关。

[0028] 理想的诊断性和/或治疗性抗体将特异性地针对存在于大量的癌症上但在任何正常组织上不存在或仅以低水平存在的抗原。能够结合与癌症特异性地相关的抗原的新型抗体的发现、表征和分离将在许多方面是有用的。首先，抗体将具有针对这些癌细胞的生物活性且能够补充免疫系统的反应从而治疗该疾病。抗体可以以单独的治疗剂施用或与目前的治疗组合施用或用来制备与毒剂连接的免疫偶联物。具有相同的特异性但当单独施用时具有低的生物活性或无生物活性的抗体也可能是有用的，因为抗体可用来制备与放射性同位素、毒素或化疗剂或包含化疗剂的脂质体的免疫偶联物，偶联形式是生物学上有活性的，凭借抗体将毒素导向包含抗原的细胞。

[0029] 如以上讨论的，已描述了特异性结合B7-H3的抗体和其他分子(参见，美国专利第7,527,969;7,368,554;7,358,354;和7,279,567号;美国专利申请公布第US 20090087416;US 20090022747;US 20090018315;US2008116219;US20080081346;US 20050202536;US20030103963;US20020168762号;PCT公布第WO 2008/116219;WO 2006/016276;WO 2004/093894;WO 04/001381;WO 2002/32375;WO 2002/10187和WO 2001/094413号;EP 1292619B;Modak,S.等人(1999年3月)“Disialoganglioside GD2And Antigen 8H9: Potential Targets For Antibody-Based Immunotherapy Against Desmoplastic Small Round Cell Tumor(DSRCT)And Rhabdomyosarcoma(RMS),”Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting,第40卷:474(美国癌症研究协会第90次年会;Philadelphia,Pennsylvania,US;1999年4月10-14日;Modak,S.等人(2000年3月)“Radioimmunotargeting To Human Rhabdomyosarcoma Using Monoclonal Antibody 8H9,”Proc.Am.Assoc.Cancer Res.41:724;Modak,S.等人(2001)“Monoclonal Antibody 8H9Targets A Novel Cell Surface Antigen Expressed By A Wide Spectrum Of Human Solid Tumors,”Cancer Res.61(10):4048-4054;Steinberger,P.等人(2004)“Molecular

Characterization of Human 4Ig-B7-H3,a Member of the B7Family with Four Ig-Like Domains,"J.Immunol.172(4):2352-2359;Xu,H.等人(2009)"MicroRNA miR-29Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3:Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors,"Cancer Res.69(15):5275-6281)。

[0030] 然而,理想的诊断性和/或治疗性抗体所期望的一个方面将是能够介导,且特别地能够加强活化针对与多种人类癌症有关的癌细胞(尤其是人的癌细胞)的免疫系统的新型抗体的发现和表征。这些组合物对于药物发现(例如,小分子)并对于细胞调控、生长和分化的进一步表征也将是有用的。

[0031] 因此,尽管有了所有之前的进展,仍需要能够结合癌细胞并能够促进或介导针对癌细胞的免疫反应的改进的组合物。这些组合物可用来诊断和治疗这些癌症。基于本文公开的发现,存在对新型组合物的进一步需要,该新型组合物特异性地识别细胞表面上的双重靶,并从而可通过减弱或增强B7-H3介导T细胞活化的能力或通过识别并杀伤表达B7-H3的癌细胞来调节B7-H3介导T细胞活化的能力。本发明的目的是鉴定这些组合物。另一个目的是提供用于测定B7-H3表达的新型化合物。

[0032] 如以下详细描述的,本发明涉及能够影响T-细胞活化的新型抗体,特别是包括包含B7-H3T-细胞活化的调节剂的双亲和再靶向试剂(dual affinity retargeting reagent)("DART™"),以及结合癌细胞的B7-H3受体并促进或介导这些细胞的死亡的新型抗体。本发明涉及这些组合物并涉及其在诊断和治疗疾病例如癌症中的用途。

[0033] 发明概述:

[0034] 本发明涉及对哺乳动物,且更特别地人B7-H3受体具有免疫反应性的抗体及其片段,且涉及其用途,特别是在治疗癌症和炎症中的用途。因此本发明特别地涉及能够介导,且更优选地能够加强活化针对与多种人类癌症有关的癌细胞的免疫系统的人源化B7-H3反应性抗体及其免疫反应性片段。

[0035] 详细地,本发明涉及分离的抗体或其免疫反应性片段,其中分离的抗体或片段包含特异性结合B7-H3的胞外域的可变域,其中抗体与抗体:BRCA69D、BRCA84D或PRCA157中的任何一种竞争结合B7-H3。

[0036] 本发明还涉及上述分离的抗体或其免疫反应性片段,其中所述抗体或片段包括可变域,所述可变域包含:

[0037] (A)BRCA69D的轻链的CDR_1(SEQ ID NO:21)、CDR_2(SEQ ID NO:23)和CDR_3(SEQ ID NO:25)和BRCA69D的重链的CDR_1(SEQ ID NO:29)、CDR_2(SEQ ID NO:31)和CDR_3(SEQ ID NO:33);

[0038] (B)BRCA84D的轻链的CDR_1(SEQ ID NO:5)、CDR_2(SEQ ID NO:7)和CDR_3(SEQ ID NO:9)和BRCA84D的重链的CDR_1(SEQ ID NO:13)、CDR_2(SEQ ID NO:15)和CDR_3(SEQ ID NO:17);或

[0039] (C)PRCA157的轻链的CDR_1(SEQ ID NO:37)、CDR_2(SEQ ID NO:39)和CDR_3(SEQ ID NO:41)和PRCA157的重链的CDR_1(SEQ ID NO:45)、CDR_2(SEQ ID NO:47)和CDR_3(SEQ ID NO:49)。

[0040] 本发明还涉及上述分离的抗体或其免疫反应性片段中的任何一种,其中抗体结合

癌细胞表面上内源表达的B7-H3。

[0041] 本发明还涉及上述分离的抗体或其免疫反应性片段中的任何一种，其中该抗体结合B7-H3，该抗体在结合表达在癌细胞表面上的B7-H3后被内化。

[0042] 本发明还涉及上述分离的抗体或其免疫反应性片段中的任何一种，该抗体为人源化的单克隆抗体。

[0043] 本发明还涉及上述分离的抗体或其免疫反应性片段中的任何一种，其中抗体是包含变体人IgG1Fc区域的修饰过的抗体，其中变体人IgG1Fc区域相对于抗体亲本的Fc区域包含至少一个氨基酸修饰，该氨基酸修饰包括改变变体Fc区域结合FcγR的亲和力或亲合力的氨基酸修饰，使得修饰过的抗体相对于亲本抗体表现出增强的效应功能。

[0044] 本发明还涉及上述分离的抗体或其免疫反应性片段中的任何一种，其中Fc区域的修饰包括：

[0045] (A)选自由下列组成的组的至少一种置换：

[0046] (1)F243L； (5)Y300L；

[0047] (2)D270E； (6)V305I；

[0048] (3)R292P； (7)A330V；和

[0049] (4)S298N； (8)P396L；

[0050] (B)至少一种两氨基酸残基置换，所述置换选自由下列组成的组：

[0051] (1)F243L和P396L；

[0052] (2)F243L和R292P；和

[0053] (3)R292P和V305I；

[0054] (C)至少一种三氨基酸残基置换，所述置换选自由下列组成的组：

[0055] (1)F243L、R292P和Y300L；

[0056] (2)F243L、R292P和V305I；

[0057] (3)F243L、R292P和P396L；和

[0058] (4)R292P、V305I和P396L；

[0059] (D)至少一种四氨基酸残基置换，所述置换选自由下列组成的组：

[0060] (1)F243L、R292P、Y300L和P396L；和

[0061] (2)F243L、R292P、V305I和P396L；

[0062] 或

[0063] (E)至少五个氨基酸残基的置换：F243L、R292P、Y300L、V305I和P396。

[0064] 本发明还涉及上述抗体，其中所述抗体包含以下置换：

[0065] (A)F243L、R292P和Y300L；

[0066] (B)L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L；或

[0067] (C)F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L。

[0068] 本发明还涉及上述抗体，其中所述抗体包含：

[0069] (A)可变域，其包含BRCA84D的轻链的CDR_1(SEQ ID NO:5)、CDR_2(SEQ ID NO:7)和CDR_3(SEQ ID NO:9)和BRCA84D的重链的CDR_1(SEQ ID NO:13)、CDR_2(SEQ ID NO:15)和CDR_3(SEQ ID NO:17)；和

[0070] (B)Fc区域的修饰，其包括以下置换：L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

[0071] 本发明还涉及上述抗体，其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

[0072] 本发明还涉及上述分离的抗体或其免疫反应性片段，其中所述抗体包含：

[0073] (A)可变轻链，其具有hBRCA84D-2VL的氨基酸序列(SEQ ID NO:89)；

[0074] (B)可变重链，其具有hBRCA84D-2VH的氨基酸序列(SEQ ID NO:99)；和

[0075] (C)Fc-区域，其具有下列置换：L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

[0076] 本发明还涉及分泌特异性结合B7-H3的胞外域的单克隆抗体的杂交瘤，其中所述抗体与BRCA69D、BRCA84D或PRCA157中的任何一种抗体竞争结合B7-H3。

[0077] 本发明还涉及编码上述分离的抗体或免疫反应性片段中的任何一种的核酸分子。

[0078] 本发明还涉及双亲和再靶向试剂(DART™)，所述试剂包含：

[0079] (A)多肽链I，其包含特异性结合B7-H3的免疫球蛋白VL表位结合结构域和特异性结合不同于B7-H3的分子的VH表位结合结构域；

[0080] 和

[0081] (B)多肽链II，其包含特异性结合B7-H3的免疫球蛋白VH表位结合结构域和特异性结合所述不同于B7-H3的分子VL表位结合结构域；

[0082] 其中多肽链I和II结合在一起以形成能够结合B7-H3和所述不同于B7-H3的分子的功能性表位结合结构域。

[0083] 本发明还涉及上述双亲和再靶向试剂(DART™)，其中可被DART™结合的不同于B7-H3的分子是半抗原，且特别地其中所述半抗原是异硫氰酸荧光素。

[0084] 本发明还涉及上述双亲和再靶向试剂(DART™)，其中可被DART™结合的不同于B7-H3的分子是T细胞受体或NKG2D受体。

[0085] 本发明还涉及上述双亲和再靶向试剂(DART™)，其中可被DART™结合的不同于B7-H3的分子是肿瘤相关抗原，且特别地，其中所述肿瘤相关抗原选自由以下组成的组：A33；ADAM-9；ALCAM；BAGE；β-连环蛋白；CA125；羧肽酶M；CD103；CD19；CD20；CD22；CD23；CD25；CD27；CD28；CD36；CD40/CD154；CD45；CD46；CD5；CD56；CD79a/CD79b；CDK4；CEA；CTLA4；细胞角蛋白8；EGF-R；EphA2；ErbB1；ErbB3；ErbB4；GAGE-1；GAGE-2；GD2/GD3/GM2；gp100；HER-2/neu；人乳头瘤病毒-E6；人乳头瘤病毒-E7；整联蛋白α-V-β-6；JAM-3；KID3；KID31；KSA(17-1A)；LUCA-2；MAGE-1；MAGE-3；MART；MUC-1；MUM-1；N-乙酰葡糖胺转移酶；制癌蛋白M；p15；PIPA；PSA；PSMA；ROR1；sTn；TNF-β受体；TNF-α受体；TNF-γ受体；转铁蛋白受体；和VEGF受体。

[0086] 本发明还涉及编码上述双亲和再靶向试剂(DART™)中的任何一种的多肽链的核酸分子。

[0087] 本发明还涉及一种药物组合物，该药物组合物包含(i)治疗有效量的上述分离的抗体或免疫反应性片段或双亲和再靶向试剂(DART™)中的任何一种，和(ii)药学可接受的载体。

[0088] 本发明还涉及上述药物组合物，其中所述抗体是人源化抗体，其包含：

[0089] (A)可变域，其包含BRCA84D的轻链的CDR_1(SEQ ID NO:5)、CDR_2(SEQ ID NO:7)和CDR_3(SEQ ID NO:9)和BRCA84D的重链的CDR_1(SEQ ID NO:13)、CDR_2(SEQ ID NO:15)和CDR_3(SEQ ID NO:17)；和

[0090] (B)Fc区域的修饰，其包括以下置换：L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

[0091] 本发明还涉及上述药物组合物，其中所述抗体是人源化抗体，其包含：

[0092] (A)可变轻链，其具有hBRCA84D-2VL的氨基酸序列(SEQ ID NO:89)；

[0093] (B)可变重链，其具有hBRCA84D-2VH的氨基酸序列(SEQ ID NO:99)；和

[0094] (C)Fc-区域，其具有下列置换：L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

[0095] 本发明还涉及上述药物组合物中还包含一种或多种另外的抗癌剂的任何一种，且特别地其中另外的抗癌剂是化疗剂、放射治疗剂、激素治疗剂或免疫治疗剂。

[0096] 本发明还涉及上述抗体或免疫反应性片段或双亲和再靶向试剂(DART™)中的任何一种在癌症诊断中的用途，其中分离的抗体、免疫反应性片段或DART™被可测检测地标记。

[0097] 本发明还涉及上述用途，特征在于所述癌症通过癌细胞的存在来表征，所述癌细胞选自由以下组成的组：肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维性组织细胞瘤、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全(fibrogenesis imperfecta ossium)、骨纤维性发育不良、胆囊或胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤性肿瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤性肿瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、罕见血液病、肾转移性癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌的细胞。

[0098] 本发明还涉及上述抗体或免疫反应性片段或双亲和再靶向试剂(DART™)中的任何一种在制备用于治疗或预防患者的癌症的药剂中的用途。本发明还涉及这些用途，特征在于所述癌症通过癌细胞的存在来表征，所述癌细胞选自由以下组成的组：肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维性组织细胞瘤、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性发育不良、胆囊或胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤性肿瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤性肿瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、罕见血液病、肾转移性癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌的细胞。

[0099] 本发明还涉及上述用途，特征在于该用途还包括施用选自由化疗、免疫治疗、放射治疗、激素治疗和手术组成的组的一种或多种另外的癌症治疗。

[0100] 附图简述：

[0101] 图1A-1B示出了使用正常的胰、肝、肺和结肠组织样本以0.625μg/ml和0.078μg/ml

的BRCA84D(图1A)和使用正常的心脏、肾和肾上腺组织以0.625μg/ml的BRCA84D(图1B)进行IHC研究的结果。

[0102] 图2示出了使用癌性的胰、乳房、结肠和肺组织样本以0.625μg/ml和0.078μg/ml的BRCA84D进行IHC研究的结果。

[0103] 图3A-3D示出了由本发明的抗体介导的剂量依赖性的再导向杀伤。图3A-3B示出了针对B7-H3反应性的单克隆抗体(效应子:靶比为20:1)对A498肾癌细胞的剂量依赖性再导向杀伤(在18小时的静息PBMC(LDH))(图3A:BRCA68D、BRCA69D、PRCA157、GB8、TCR-4420;图3B:OVCA22、BRCA84D、TDH6、TES7、TCR-4420)。图3C-3D示出了针对B7-H3反应性的单克隆抗体(效应子:靶比为30:1)对A549肺癌细胞的剂量依赖性的再导向杀伤(在18小时的静息PBMC(LDH))(图3C:BRCA84D、OVCA22、PRCA157、TES7;图3D:TDH6、BRCA68D、BRCA69D)。

[0104] 图4A-4B示出了抗B7-H3抗体结合可溶性B7H3-2Ig(图4A)和可溶性B7H3-4Ig B7-H3(图4B)的能力(抗体浓度为100nM)。图例:(A)BLA8;(B)BRCA165;(C)BRCA68D;(D)BRCA69D;(E)BRCA84D;(F)GB8;(G)LUCA1;(H)LUCA50;(I)OVCA21;(J)OVCA22;(K)PA20;(L)PRCA123;(M)SG24;(N)SG27;(O)STO9;(P)TDH4(184-192);(Q)TDH4;(R)TDH5;(S)TES7。图例的垂直位置与相应曲线的位置关联。

[0105] 图5A-5S展示了溶液中的抗原与被捕获的单克隆抗体之间的结合亲和力(实线;B7-H3(4Ig)100nM;虚线;B7-H3,100nM)。

[0106] 图6A-6I示出了固定的B7-H3抗体与B7-H3-2Ig(灰色虚线)或B7-H3-4Ig(黑色实线)的BIACORE™分析的结果。从0.063μM至1μM滴定抗体。时间以秒计。

[0107] 图7提供了抗体PRCA157、BRCA69D、BLA8、PA20、BRCA84D、GB8和SG27的对比BIACORE™分析。

[0108] 图8提供了BIACORE™分析,该分析表明抗体BRCA68D、BRCA69D和PRCA157不与BRCA84D竞争结合人B7-H3。

[0109] 图9A-9B示出了关于本发明的抗B7-H3抗体在结合癌细胞后被内化的能力的研究结果(图9A,前列腺CSC细胞;图9B,Hs700t胰细胞)。

[0110] 图10A-10F示出了本发明的抗B7-H3抗体互相交叉阻碍的能力,从而揭露出重叠或独特的表位。使用十倍过量的竞争抗体。

[0111] 图11A-11B示出了BRCA84D和其人源化衍生物hBRCA84D的可变轻链(图11A)或可变重链(图11B)的氨基酸残基的比对。

[0112] 图12示出了hBRCA84D轻链衍生物BRCA84D-3VL、BRCA84D-4VL和BRCA84D-5VL对人B7-H3的相对结合亲和力。

[0113] 图13示出了hBRCA84D重链衍生物BRCA84D-2VH、BRCA84D-3VH和BRCA84D-4VH对人B7-H3的相对结合亲和力。

[0114] 图14示出了(1)包含hBRCA84D-2VL与hBRCA84D-2VH的抗体(试验1和2),(2)嵌合的BRCA84D,(3)包含hBRCA84D-5VL与嵌合的BRCA84D-HC的抗体和(4)包含hBRCA84D-5VL与hBRCA84D-2VH的抗体的相对结合亲和力。

[0115] 图15示出了在鼠异种移植模型系统中,Fc-修饰的人源化抗B7-H3抗体体内抑制HT-1197膀胱癌细胞的肿瘤生长的能力。植入癌细胞后7天、14天、21天和28天,对小鼠(以1μg/kg、10μg/kg或20μg/kg的剂量)施用Fc-修饰的hBRCA84D-2抗体(包含Fc修饰L235V、

F243L、R292P、Y300L和P396L)。

[0116] 图16示出了在鼠异种移植模型系统中,Fc-修饰的人源化抗B7-H3抗体体内抑制A498肾癌细胞的肿瘤生长的能力。植入癌细胞后7天、14天、21天和28天,对小鼠(以1μg/kg、10μg/kg或20μg/kg的剂量)施用Fc-修饰的hBRCA84D-2抗体(包含Fc修饰L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L)。

[0117] 图17A-17D示出了hBRCA84D-2/抗TCR DART™("T-DART™")介导对SK-MES-1肺癌细胞、A498肾癌细胞、LNCaP前列腺癌细胞和UACC-62黑色素瘤细胞的再导向杀伤的能力。

[0118] 图18A-18C示出了抗B7-H3Mab1在雄性无肿瘤的雄性mCD16-/-,hCD16A_FOXN1小鼠的血清中的药物代谢动力学衰变(图18A-18B)。图18C示出了使用2室模型从5mg/kg剂量的参数推测出的在0.1、0.5、1、5和10mg/kg下产生的药物代谢动力学特征。

[0119] 图19示出了HT-1197膀胱癌细胞系的HER2和PRCA135的相对表达。

[0120] 图20示出了抗B7-H3抗体hBRCA84D变体对HT-1197细胞的结合亲和力。

[0121] 图21A-21C示出了HT-1197的鼠异种移植分析的结果。数组8只雌性小鼠接受介质或10mg/kg的IgG对照,或1、5或15mg/kg剂量的西妥昔单抗或0.1、0.5、1、5或10mg/kg剂量的抗B7-H3抗体Mab1(Q7D x5)。每3-4天进行肿瘤测量。图21A示出了抗B7-H3抗体Mab1在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力。与IgG对照的比较:来自第51天的Mab1(1和5mg/kg)对IgG对照***;来自第48天的Mab1(10mg/kg)对IgG对照**。图21B示出了西妥昔单抗在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力。来自第51天的西妥昔单抗(7mg/kg)对IgG对照**;来自第58天的西妥昔单抗(15mg/kg)对IgG对照***。图21C比较了在所测试的最大剂量时获得的结果。

[0122] 图22A-22B示出了HT-1376膀胱癌细胞系的HER2和PMSA的相对表达。

[0123] 图23示出了HT-1376的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或1.0mg/kg的抗B7-H3抗体Mab1(Q7D x4)。

[0124] 图24示出了AGS的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或0.5、1、5或10mg/kg剂量的10mg/kg的抗B7-H3抗体Mab1(Q7D x5)。

[0125] 图25示出了在与hBRCA84D、chBRCA84D和hBRCA84(Fc Var1)变体抗B7-H3抗体(E:T比=25:1;效应子=人PBMC;LDH测定读出值)孵育后的A549肺癌细胞的体外细胞毒性测定的结果。

[0126] 图26示出了A549的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或1.0mg/kg的抗B7-H3抗体Mab1(Q7D x4)。

[0127] 图27示出了CaLu3的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或0.5、1或5mg/kg(Q7D x5)的抗B7-H3抗体Mab1或IgG对照(10mg/ml)。

[0128] 图28A-28C示出了LOX-IMVI黑色素瘤癌细胞的鼠异种移植分析的结果。数组8只雌性小鼠接受介质或5mg/kg的IgG对照或5、10或20mg/kg剂量的多西他赛或0.5、1、5或10mg/kg剂量的抗B7-H3抗体Mab1。图28A示出了抗B7-H3抗体Mab1在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力。图28B示出了多西他赛在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力。图28C比较了在所测试的最大剂量时获得的结果。

[0129] 图29示出了UACC-62黑色素瘤癌细胞的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或5mg/kg的IgG对照或0.5、1、5或10mg/kg剂量的抗B7-H3抗体Mab1。

[0130] 图30A-30C示出了2rv前列腺腺癌细胞的鼠异种移植分析的结果。数组8只雌性小鼠接受介质或10mg/kg的IgG对照或1、7或15mg/kg剂量的曲妥珠单抗或0.5、1、5或10mg/kg剂量的抗B7-H3抗体Mab1。图30A示出了抗B7-H3抗体Mab1在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力。图30B示出了曲妥珠单抗在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力。图30C比较了在所测试的最大剂量时获得的结果。

[0131] 图31示出了在与hBRCA84D、chBRCA84D和hBRCA84(Fc Var1)变体抗B7-H3抗体(E:T比＝25:1;效应子＝人PBMC;LDH测定读出值)孵育后的A498肾癌细胞的体外细胞毒性分析的结果。

[0132] 图32示出了A498肾癌细胞的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或10mg/kg的IgG对照或0.1、0.5、1、5或10mg/kg剂量的抗B7-H3抗体Mab1。对对照组的小鼠施用1、7或15mg/kg剂量的西妥昔单抗(抗EGRF抗体)。

[0133] 图33A-33B对比西妥昔单抗示出了786-0肾癌细胞的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或10mg/kg的IgG对照或0.1、0.5、1、5或10mg/kg剂量的抗B7-H3抗体Mab1。对对照组的小鼠施用1、7或15mg/kg剂量的西妥昔单抗(抗EGRF抗体)。

[0134] 图34对比紫杉醇示出了786-0肾癌细胞的鼠异种移植分析的结果。数组小鼠接受介质或5mg/kg的IgG对照或0.1、0.5、1、5或10mg/kg剂量的抗B7-H3抗体Mab1。对对照组的8只这样的小鼠施用2.5mg/kg剂量的紫杉醇。

[0135] 发明详述:

[0136] 本发明涉及对哺乳动物,且更特别地对人B7-H3受体具有免疫反应性的抗体及其片段,并涉及其用途,特别是在治疗癌症和炎症中的用途。因此本发明特别地涉及能够介导且更优选地能够加强活化针对与多种人类癌症有关的癌细胞的免疫系统的人源化B7-H3反应性抗体和其免疫反应性片段。

[0137] I.常规技术

[0138] 除非另外指明,本发明的实践将采用本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的传统技术。以下文献中充分地解释了这些技术,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Edition(Sambrook等人编辑,2001)Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY;Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications(Methods in Molecular Biology),Herdewijn,P.,Ed.,Humana Press,Totowa,NJ;Oligonucleotide Synthesis(Gait,M.J.,编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press,Totowa,NJ;Cell Biology:A Laboratory Notebook(Cellis,J.E.,编辑,1998)Academic Press,New York,NY;Animal Cell Culture(Freshney,R.I.,编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(Mather,J.P.和Roberts,P.E.,编辑,1998)Plenum Press,New York,NY;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(Doyle,A.等人,编辑,1993-8)John Wiley和Sons,Hoboken,NJ;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.)New York,NY;Weir's Handbook of Experimental Immunology(Herzenberg,L.A.等人编辑1997)Wiley-Blackwell Publishers,New York,NY;Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(Miller,J.M.等人编辑,1987)Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY;Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel,F.M.等人,编辑,1987)Greene Pub.Associates,New York,NY;PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis,K.等人,编辑,1994)Birkhäuser,Boston MA;Current Protocols in Immunology(Coligan,J.E.等

人,编辑,1991)John Wiley和Sons,Hoboken,NJ;Short Protocols in Molecular Biology(John Wiley和Sons,1999)Hoboken,NJ;Immunobiology 7(Janeway,C.A.等人2007)Garland Science,London,UK;Antibodies(P.Finch,1997)Stride Publications,Devoran,UK;Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.,编辑,1989)Oxford University Press,USA,New York NY);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(Shepherd,P.等人编辑,2000)Oxford University Press,USA,New York NY;Using antibodies:A Laboratory Manual(Harlow,E.等人编辑,1998)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;The Antibodies(Zanetti,M.等人编辑1995)Harwood Academic Publishers,London,UK);和DeVita,Hellman,and Rosenberg's Cancer:Principles&Practice of Oncology,Eighth Edition,DeVita,V.等人编辑2008,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA。

[0139] II.定义

[0140] 如本文所用的,术语"B7-H3"指人B7家族的蛋白质的成员,一种也称为CD276的具有Ig样结构域的I型膜蛋白。术语"2Ig-B7-H3"表示仅包含两个Ig样结构域的B7-H3形式;术语"4Ig-B7-H3"表示包含四个Ig样结构域的B7-H3形式(参见,Sun,M.等人(2002)"Characterization of Mouse and Human B7-H3Genes,"J.Immunol.168:6294-6297;Steinberger等人(2004),"Molecular Characterization Of Human 4Ig-B7-H3,A Member Of The B7Family With Four Ig-Like Domains,"J.Immunol.2004,172(4):2352-2359和Castriconi等人(2004)"Identification Of 4Ig-B7-H3As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis,"Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)101(34):12640-12645)。抗原"TES7"(WO 2008/066691)是共有4Ig-B7-H3的特征的抗原。因此,特异性结合TES7的抗体结合4Ig-B7-H3。TES7抗原可具有不止一个的不同表位,且表位可以是非线性的。已知多种抗B7-H3抗体结合非线性表位,包括仅存在于4Ig-B7-H3同种型上的某些表位。目前认为与它们的正常组织的对应物相比,TES7可能在某些癌细胞中过表达。

[0141] B7-H3功能的激动剂、拮抗剂和其他调节剂被明确地包括在本发明的范围内。这些激动剂、拮抗剂和调节剂是包含B7-H3的一个或多个抗原决定簇位点或包含这些位点的一个或多个片段,这些位点的变体或这些位点的类肽的多肽。这些激动剂、拮抗剂和B7-H3的调节性化合物以线性或环化形式提供,且任选地包含至少一个自然界中不经常发现的氨基酸残基或至少一个酰胺电子等排体。这些化合物可被糖基化。

[0142] 更具体地,如本文所用的术语"B7-H3调节剂"被定义为(1)能够破坏或阻碍人B7-H3和其天然配体或抗B7-H3抗体之间的相互作用;(2)能够结合人B7-H3和其天然配体或抗B7-H3抗体;(3)包含可用于产生能够结合人B7-H3和其天然配体或抗B7-H3抗体的抗体的抗原位点;(4)包含可用于筛选能够结合人B7-H3和其天然配体或抗B7-H3抗体的抗体的抗原位点;(5)包含可用于产生能够破坏或阻碍人B7-H3和其天然配体或抗B7-H3抗体之间的相互作用的抗体的抗原位点;(6)包含可用于筛选能够破坏或阻碍人B7-H3和其天然配体或抗B7-H3抗体之间的相互作用的抗体的抗原位点的任何化合物。取决于其活性是否分别增强T细胞活化或抑制T细胞活化,B7-H3调节剂可以是"B7-H3激动剂"或"B7-H3拮抗剂"。

[0143] B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂包括B7-H3变体、B7-H3肽拮抗剂、类肽物和小分子、抗B7-H3抗体和免疫球蛋白变体、人B7-H3的氨基酸变体,包括氨基酸置换、缺失和添加的变

体或其任何组合及嵌合免疫球蛋白。本发明的B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂基于参与将人B7-H3结合到其天然配体或抗B7-H3抗体的B7-H3结构域的鉴定。因此，本发明提供了具有复制或模仿人B7-H3的一个或多个抗B7-H3结合结构域的分子结构的B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂。

[0144] 如本文所用的，术语“B7-H3变体”表示人B7-H3的任何氨基酸变体，包括氨基酸置换、缺失和添加的变体或其任何组合。该定义包括嵌合分子例如人B7-H3/非人嵌合体和其他杂交分子。该定义还包括B7-H3变体分子的任何片段，该片段包含该分子的变异区域或杂交区域。

[0145] 如本文所用的，“抗体”是免疫球蛋白分子，其能够通过位于该免疫球蛋白分子的可变区的至少一个抗原识别位点特异性结合靶例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文所用的，该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体，而且包括其片段(例如Fab、Fab’、F(ab’)2Fv)、单链(ScFv)、其突变体、天然存在的变体、包含具有所需特异性的抗原识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、“BiTEs®”、“DART™”分子和包含具有所需特异性的抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子构型。

[0146] 术语“BiTE”(双特异性T细胞衔接子)是指具有两个抗原结合结构域的单个多肽链分子，其中一个抗原结合结构域结合T-细胞抗原且其第二个结合存在于靶的表面上的抗原(WO 05/061547;Baeuerle,P等人(2008)“*BiTE®*:A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells,”Drugs of the Future 33:137-147;Bargou,等人2008)“Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody,”Science 321:974-977)。

[0147] 术语“DART™”(双亲和再靶向试剂)指包含结合在一起(尤其是通过共价相互作用)形成可识别相同或不同表位的至少两个表位结合位点的至少两条多肽链的免疫球蛋白分子。DART™的每条多肽链包含免疫球蛋白的轻链可变区和免疫球蛋白的重链可变区，但是这些区域不会相互作用形成表位结合位点。更确切地，DART™的多肽链中的一条(例如，第一条)的免疫球蛋白的重链可变区与不同的(例如，第二条)DART™多肽链的免疫球蛋白的轻链可变区相互作用形成表位结合位点。相似地，DART™的多肽链中的一条(例如，第一条)的免疫球蛋白的轻链可变区与不同的(例如，第二条)DART™多肽链的免疫球蛋白重链可变区相互作用形成表位结合位点。DART™可以是单特异性、双特异性、三特异性的等等，从而能够同时结合一个、两个、三个或更多个不同的表位(其可以是相同或不同抗原的表位)。另外DART™可以是单价、二价、三价、四价、五价、六价的等等，从而能够同时结合一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个分子。DART™的这两个特性，即，特异性程度和化合价可被组合例如以产生四价(即，能够结合四组表位)的双特异性抗体(即，能够结合两个表位)，等等。PCT公布WO 2006/113665、WO 2008/157379和WO 2010/080538中公开了DART™分子。

[0148] 术语“单克隆抗体”指同源抗体群，其中单克隆抗体包括参与选择性结合抗原的氨基酸(天然存在和非天然存在的氨基酸)。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原位点定位。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体，而且包括其片段(例如Fab、Fab’、F(ab’)2Fv)、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合单克隆抗体、和包含具有所需特异性和结合抗原的能力的抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子构型。关于抗体的来源或其制备方式(例如，通过杂交瘤、噬菌体

筛选、重组表达、转基因动物等)，不期望被限制。该术语包括以上在“抗体”的定义下描述的完整免疫球蛋白以及片段等。

[0149] 术语“人源化抗体”指一种嵌合分子，该嵌合分子通常使用重组技术制备，具有衍生自来自非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点，且该分子剩余的免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可包含融合到恒定域的完整可变域或仅包含嫁接到可变域中的合适框架区的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型或经一个或多个氨基酸置换修饰。这去除了在人类个体中作为免疫原的恒定区，但是对外来可变区的免疫反应的可能性仍存在(LoBuglio,A.F.等人(1989)“Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man:Kinetics And Immune Response,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)86:4220-4224)。另一种方法不仅集中在提供人来源的恒定区，而且还对可变区进行修饰以尽可能接近人形式地对其重塑。已知重链和轻链的可变区都包含三个互补决定区(CDR)，这些互补决定区在对目的抗原的反应方面不同并决定结合能力，其侧翼有在给定物种中相对保守并推定地为CDR提供支架的四个框架区(FR)。当制备相对于特定抗原的非人类抗体时，可通过将衍生自非人类抗体的CDR嫁接到待修饰的人类抗体中存在的FR上来对可变区“重塑”或“人源化”。Sato,K.等人(1993)Cancer Res 53:851-856;Riechmann,L.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies for Therapy,”Nature 332:323-327;Verhoeyen,M.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies:Grafting An Antilysozyme Activity,”Science 239:1534-1536;Kettleborough,C.A.等人(1991)“Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting:The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,”Protein Engineering 4:773-3783;Maeda,H.等人(1991)“Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,”Human Antibodies Hybridoma 2:124-134;Gorman,S.D.等人(1991)“Reshaping A Therapeutic CD4Antibody,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)88:4181-4185;Tempest,P.R.等人(1991)“Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,”Bio/Technology 9:266-271;Co,M.S.等人(1991)“Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)88:2869-2873;Carter,P.等人(1992)“Humanization Of An Anti-p185her2Antibody For Human Cancer Therapy,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)89:4285-4289;和Co,M.S.等人(1992)“Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33Antigen,”J.Immunol.148:1149-1154已报道了该方法在多种抗体中的应用。在某些实施方式中，人源化抗体保留了全部的CDR序列(例如，包含来自小鼠抗体的全部六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其他实施方式中，人源化抗体具有相对于原始抗体已被改变的一个或多个CDR(一、二、三、四、五、六个)，这些CDR也被称为“衍生自”原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0150] 如本文所用的，如果抗体或多肽相对于替代表位更频繁、更快速、以更长的持续时间和/或以更大的亲和力结合该表位的话，则该抗体或多肽被表述成“特异性地”结合另一个分子的区域(即，表位)。例如，特异性结合B7-H3表位的抗体是与结合其他B7-H3表位或非B7-H3表位相比，其以更大的亲和力、亲合力，更容易地，和/或以更长的持续时间结合该B7-H3表位。通过阅读该定义还应理解，例如，特异性结合第一靶的抗体(或部分或表位)可能或

可能不特异性或优先地结合第二靶。因此，“特异性结合”不一定需要(虽然其可以包括)专一结合。通常，但不一定地，述及结合是指“特异性的”结合。

[0151] 如本文所用的，有关表位是或“保持免疫学上有活性的”的术语“免疫学上有活性的”是指抗体(例如，抗B7-H3抗体)在不同条件下例如，表位已经受还原和变性条件之后结合该表位的能力。

[0152] 不同的生物学功能与抗B7-H3抗体有关，包括，但不限于下列一种或多种：特异性结合B7-H3(且特别是表达在包括但不限于肾癌、前列腺癌或肺癌细胞的癌细胞的表面上的B7-H3分子)的能力；竞争性地抑制已知抗B7-H3抗体优先结合B7-H3的能力，包括优先结合原始抗体优先结合的同一B7-H3表位的能力；体外或体内结合B7-H3暴露在活细胞表面上的部分的能力；体外或体内结合B7-H3的暴露在例如但不限于前列腺、肺或肾癌细胞的活的癌细胞的表面上的部分的能力；向其表面上表达B7-H3的癌性细胞(例如，肾癌、前列腺癌或肺癌细胞)递送化疗剂的能力；和/或向其表面上表达B7-H3的癌细胞递送化疗剂或可检测标志的能力。如本文所讨论的，本发明的多肽(包括抗体)可具有这些特征中的任何一种或多种。

[0153] “抗B7-H3等效抗体”或“抗B7-H3等效多肽”指具有与抗B7-H3抗体相关的一种或多种生物功能，诸如例如结合特异性的抗体或多肽。

[0154] 如本文所用的，术语“剂”指生物学、药学或化学的化合物。非限制性实例包括简单或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白质、寡核苷酸、抗体、抗体衍生物、抗体片段、维生素衍生物、碳水化合物、毒素或化疗性化合物。可合成多种化合物，例如，小分子和低聚体(例如，寡肽和寡核苷酸)和基于不同的核心结构的合成有机化合物。另外，多种自然来源例如植物或动物提取物及类似物可提供用于筛选的化合物。

[0155] 可随机选择或合理选择或设计本发明的方法中使用的剂。如本文所用的，当不在先考虑或了解参与分子与其天然结合配体或已知抗体的结合的具体氨基酸或其他化学部分而选择剂时，剂被表述为被随机选择。随机选择的剂的实例是通过使用并筛选化合物库或肽组合库鉴定到的剂。

[0156] 如本文所用的，当在考虑了与剂的作用有关的靶位点的序列和/或其构型的非随机基础上选择剂时，剂被表述为被合理地选择或设计。关于抗B7-H3的剂，目前认为B7-H3上存在针对其可产生抗体的至少三种表位且因此对于阻碍B7-H3/抗B7-H3相互作用的剂存在至少三个作用部位。本发明还包括在B7-H3和其天然结合配体的相互作用位点处发挥作用的剂，但是无论是目前已知的还是随后鉴定到的其他配体和其有效B7-H3-相互作用位点也包括在本发明的范围内。可通过利用组成受体/配体和/或B7-H3/抗B7-H3抗体复合物的接触位点的肽序列来合理地选择或合理地设计剂。例如，合理选择的肽剂可以是这种肽，当该肽在其天然环境中暴露于活细胞表面时，其氨基酸序列与呈现在B7-H3上的表位相同。如所期望的，这种剂将通过结合抗B7-H3抗体或结合天然配体，减弱或妨碍抗B7-H3抗体与B7-H3的结合，或B7-H3与其天然配体的结合。

[0157] 如本文所用的，关于抗体的术语“标记的”意在包括通过将可检测的物质例如放射剂或荧光团(例如，藻红蛋白(PE)或异硫氰酸荧光素(还称为荧光异硫氰酸酯或FITC)偶联到(即，物理交联)抗体上来直接标记抗体，以及通过与可检测物质的反应性间接标记探针或抗体。

[0158] 如本文所用的，关于抗体的术语“结合”包括剂(例如，化疗剂)与抗体的共价和非共价连接或结合。抗体与剂(例如，化疗剂)的结合可通过直接结合或经连接至共同的平台间接结合，使得抗体将剂定位到该抗体结合的癌性细胞，且其中抗体和剂在生理条件下基本上不会解离，使得剂不会被靶向到抗体结合的同一癌性细胞或使得剂的效价不被降低。

[0159] 术语“生物样品”包括从个体获得的多种样品类型并可用于诊断或监测测定中。该定义包括生物来源的唾液、血液和其他液态样品、固态组织样品例如活组织检查样本或组织培养物或从其获得的细胞，和其后代，例如，从收集自疑似患癌症的个体的组织样品，在优选的实施方式中，从卵巢、肺、前列腺、胰、结肠和乳房组织获得的细胞。该定义还包括在获得它们以后已以任何方式操作过的样品，例如通过用试剂处理、增溶或富集某些组分例如蛋白质或多核苷酸或为了切片目的包埋到半固体或固体基质中。术语“生物样品”包括临床样品，且还包括正在培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解液、血清、血浆、生物学流体和组织样品。

[0160] 术语“宿主细胞”包括可以是或已经是用于整合多核苷酸插入物的载体的接受体的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代，且由于天然的、偶然的或故意的突变该后代可能不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态方面或在基因组DNA互补方面)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸体内转染的细胞。

[0161] 如本文所用的，术语“延迟转移的形成”含义是推迟、阻碍、减缓、阻滞、稳定和/或延缓转移的形成。取决于待治疗的癌症和/或个体的病史，这种延迟可以是不同的时间长度。如对本领域技术人员明显的，足够或显著的延迟实际上可包括预防，因为个体未形成转移。

[0162] 如本文所用的，在一个实施方式中，药物组合物的“有效量”是足以实现有益或期望结果的量，所述结果包括但不限于临床结果，例如缩小肿瘤的尺寸(就癌症例如乳腺癌或前列腺癌来讲)、阻滞癌性细胞的生长、延迟转移的形成、减少由疾病产生的症状、提高患该疾病的个体的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药剂的剂量、例如通过靶向和/或内化增强另一种药物的疗效、延迟疾病的进展和/或延长个体的存活期。有效量可以以一次或多次施用来施用。为了本发明的目的，药物、化合物或药物组合物的有效量是足以降低癌性细胞的增殖(或破坏癌性细胞)并足以直接或间接地减少和/或延迟癌性细胞转移的形成或增长。在某些实施方式中，药物、化合物或药物组合物的有效量可以或可以不联合另一种药物、化合物或药物组合物来达到。因此，可在施用一种或多种化疗剂的情况中考虑“有效量”，且如果联合一种或多种其他剂可能实现或实现期望的结果，可考虑以有效量给予单一的剂。虽然个体的需要不同，每种组分的有效量的最佳范围的确定是本领域技术范围之内的。典型的剂量包括0.1至100mg/kg/体重。优选的剂量包括1至100mg/kg/体重。最优选的剂量包括10至100mg/kg/体重。

[0163] 如本文所用的，当核酸分子、剂、抗体、组合物或细胞等基本上与其原始来源中天然存在的污染性核酸分子、抗体、剂、组合物或细胞等分离时，该核酸分子或剂、抗体、组合物或细胞等被表述成“分离的”。

[0164] 术语“个体”指脊椎动物，优选地哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人、家畜、运动动物、宠物、灵长类、小鼠和大鼠。在最优选的实施方式中，术语个体表示人。

[0165] 本文中可互换地使用术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”以表示任何长度的氨

基酸的聚合物。聚合物可以是直链的或支链的，其可包含修饰过的氨基酸，且其中可以插入非氨基酸。该术语还包括已天然地或通过干预例如，二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰，例如与标记组分偶联而被修饰的氨基酸聚合物。还包括在该定义内的是例如，包含一个或多个氨基酸类似物(包括，例如，非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。应理解，因为本发明的多肽是基于抗体的，该多肽可形成为单链或结合在一起的链。

[0166] 还包括在本发明的范围内的是本文所述的B7-H3肽激动剂、拮抗剂和调节剂(包括抗B7-H3抗体)的类肽物。这些类肽物包括其中至少一个氨基酸残基被自然界中不经常发现的氨基酸残基(例如氨基酸的D型异构体或氨基酸的N-烷基化的物类)置换的肽。在其他实施方式中，类肽物通过用酰胺电子等排体取代B7-H3肽激动剂、拮抗剂和调节剂中的至少一个酰胺键(-C(=O)-NH-)来构建。合适的酰胺电子等排体包括-CH_2-NH-、-CH_2-S-、-CH_2-S(O)-、-CH_2-S(O)$_2$-、-CH_2-CH_2-、-CH=CH-(E或Z形式)、-C(=O)-CH_2-、-CH(CN)-NH-、-C(OH)-CH_2-和-O-C(=O)-NH-。为用于被酰胺电子等排体替代的合适候选的B7-H3肽激动剂、拮抗剂和调节剂中的酰胺键包括可被B7-H3肽激动剂、拮抗剂和调节剂治疗的预期受治疗者的内源酯酶或蛋白酶水解的键。

[0167] 如本文所用的，术语“基本纯”是指至少50％纯(即，不含污染物)，更优选地至少90％纯，更优选地至少95％纯，更优选地至少98％纯，更优选地至少99％纯且最优选地大于99％纯的材料。

[0168] 如本文所用的，术语“毒素”指在细胞内造成不利反应的任何物质。例如，定位到癌性细胞的毒素将对癌性细胞产生不利的、有时有害的作用。毒素的实例包括但不限于紫杉烷、美登木素、阿里他汀(auristatin)(例如，单甲基阿里他汀(MMAE)、单甲基阿里他汀F(MMAF)、阿里他汀E(AE)等)(例如在美国专利第5,208,020;5,416,064;6,333,410;6,340,701;6,372,738;6,436,931;6,441,163;6,596,757;7,276,497;7,585,857;或7,851,432号中公开的阿里他汀)、卡奇霉素、蒽环(例如，阿霉素)、CC-1065类似物、多西他赛;组织蛋白酶B或E;蓖麻毒素、多花白树毒蛋白、假单胞菌(Pseudomonas)外毒素、白喉毒素和RNA酶;放射标记的抗体(例如，tiuxetan-偶联的或标记有毒性放射性同位素(例如，^{90}Y、^{131}I、^{177}Lu、^{186}Re、^{188}Re、^{211}At、^{212}Bi、^{213}Bi、^{225}Ac等)。

[0169] 如本文所用的，术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”表示用于获得有益的或期望的结果、包括且优选地是有益或期望的临床结果的方法。这些有益或期望的临床结果包括但不限于以下一种或多种:减少癌性细胞或其他病态细胞的增殖(或破坏)、减少癌症中发现的癌性细胞的转移、缩小肿瘤的尺寸、减少由疾病产生的症状、提高患该疾病的个体的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药剂的剂量、延迟疾病的进展和/或延长个体的存活期。

[0170] 如本文所用的，术语癌症预期包括由癌细胞的存在表征的癌症，所述癌细胞选自由以下组成的组:肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、骨癌(造釉细胞瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维性组织细胞瘤、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性发育不良、胆囊或

胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾胚细胞癌)、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤性肿瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤性肿瘤、肝癌(肝胚细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、罕见血液病、肾转移性癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌(宫颈癌、子宫内膜癌和平滑肌瘤)的细胞。

[0171] III.制备抗体和多肽的方法

[0172] 制备单克隆抗体的方法是本领域已知的。可采用的一种方法是Kohler,G.等人(1975)“Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,”Nature 256:495-497的方法或其修改版。通常,在非人类物种,例如小鼠中研发单克隆抗体。一般地,使用小鼠或大鼠用于免疫但是也可使用其他动物。抗体通过用免疫原量的包含人B7-H3的细胞、细胞提取物或蛋白质制剂免疫小鼠而产生。免疫原可以是但不限于原代细胞、培养的细胞系、癌性细胞、核酸或组织。在一个实施方式中,使用了人肺癌细胞。用于免疫的细胞,例如人的睾丸或胰腺癌或胃细胞在它们用作免疫原之前,可培养一段时间(例如,至少24小时)。可使用细胞(例如,人的睾丸、胃或胰的腺癌细胞)本身或与不变性的佐剂例如Ribi组合作为免疫原。一般地,细胞应保持完好且优选地当用作免疫原时是存活的。相比破损的细胞,完好的细胞可允许免疫过的动物更好地检测抗原。变性或苛刻的佐剂,例如弗氏佐剂的使用可损坏细胞且因此不被提倡。免疫原可以以周期性的间隔例如每两周或每周地多次施用,或可以以维持动物存活力(例如,在组织重组体中)的那种方式施用。

[0173] 在一个实施方式中,通过使用过表达B7-H3的宿主细胞作为免疫原获得结合B7-H3的单克隆抗体。示例性而非限制地,这些细胞包括人肺癌细胞和人结肠癌细胞。

[0174] 为监测抗体反应,可从动物获得小份的生物样品(例如,血液)并测试其对免疫原的抗体滴度。可取出脾和/或几个大的淋巴结并离解成单个细胞。如需要的话,可通过将细胞悬浮液涂到包被有抗原的板或孔来筛选脾细胞(去除非特异性粘附细胞之后)。表达抗原特异性的膜结合免疫球蛋白的B细胞将结合该培养板,且不会被剩余的悬浮液冲洗掉。然后所得的B细胞或所有分开的脾细胞可与骨髓瘤细胞(例如,X63-Ag8.653和来自SaIk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,CA的那些细胞)融合。聚乙二醇(PEG)可用来将脾或淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤。然后可在选择性培养基(例如,次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷培养基,以另外的方式称为“HAT培养基”)中培养杂交瘤。然后通过有限稀释将所得的杂交瘤铺到培养板上并使用例如FACS(荧光激活细胞分选术)或免疫组织化学(IHC)筛选来测定特异性结合免疫原的抗体的产生。然后体外(例如,在组织培养瓶或中空的纤维反应器中)或体内(例如,作为小鼠体内的腹水)培养所选择的分泌单克隆抗体的杂交瘤。

[0175] 作为细胞融合技术的另一种替代方案,Epstein-Barr病毒(EBV)永生化的B细胞可用来产生本发明的单克隆抗体。如需要的话,对杂交瘤进行扩增和亚克隆,并通过传统的测定方法(例如,FACS、IHC、放射免疫检定、酶免疫测定、荧光免疫测定等)测定上清液的抗免

疫原活性。

[0176] 在另一个替代方案中，抗B7-H3单克隆抗体和任何其他等效抗体可被测序并通过本领域已知的任何手段(例如，人源化、使用转基因小鼠来产生完整的人抗体、噬菌体展示技术等)重组产生。在一个实施方式中，对抗B7-H3单克隆抗体测序并然后将多核苷酸序列克隆到用于表达或增殖的载体中。编码目的抗体的序列可保持在宿主细胞内的载体中且然后可扩增该宿主细胞并将其冷冻以将来使用。

[0177] 抗B7-H3单克隆抗体和任何其他等效抗体的多核苷酸序列可用于基因操作以产生“人源化的”抗体以提高抗体的亲和力或其他特征。人源化一种抗体的通用原理包括保留该抗体的抗原结合部分的基础序列，同时用人抗体序列取代抗体的非人类的剩余部分。有四个常规步骤来人源化单克隆抗体。这四个步骤是：(1)确定初始抗体轻链和重链可变域的核苷酸和预测的氨基酸序列(2)设计人源化的抗体，即决定在人源化过程期间使用哪种抗体框架区(3)实际的人源化方法学/技术和(4)人源化抗体的转染和表达。参见，例如，美国专利第4,816,567;5,807,715;5,866,692;和6,331,415号。

[0178] 已描述了包含衍生自非人类的免疫球蛋白的抗原结合位点的许多“人源化的”抗体分子，包括具有融合到人恒定域的啮齿动物V区或修饰过的啮齿动物V区及其有关的互补决定区(CDR)的嵌合抗体(参见，例如，Winter等人(1991)“Man-made Anditbodies,”Nature 349:293-299;Lobuglio等人(1989)“Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man:Kinetics And Immune Response,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)86:4220-4224(1989),Shaw等人(1987)“Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody(17-1A)To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen,”J.Immunol.138:4534-4538,和Brown等人(1987)“Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody,”Cancer Res.47:3577-3583)。其他参考文献描述了在与合适的人抗体恒定域融合之前被嫁接到人支撑框架区(FR)的啮齿动物CDR(参见，例如，Riechmann,L.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies for Therapy,”Nature 332:323-327;Verhoeyen,M.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies:Grafting An Antilysozyme Activity,”Science 239:1534-1536;和Jones等人(1986)“Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse,”Nature 321:522-525)。另一参考文献描述了被重组镶嵌的啮齿动物框架区支撑的啮齿动物CDR。参见，例如，欧洲专利公布第519,596号。这些“人源化的”分子被设计成将不想要的针对啮齿动物抗人抗体分子的免疫反应最小化，这种不想要的免疫反应限制了那些部分在人类接受体中的治疗应用的持续期和有效性。Daugherty等人(1991)“Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning,CDR-Grafting,And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18Component Of Leukocyte Integrins,”Nucl.Acids Res.19:2471-2476和美国专利第6,180,377;6,054,297;5,997,867;和5,866,692号中公开了还可使用的人源化抗体的其他方法。

[0179] 本发明还包括本发明的抗体，例如鼠抗B7-H3的单链可变区片段(“scFv”)。通过借助于使用短的连接肽连接轻链和/或重链可变区制备单链可变区片段。Bird等人(1988)(“Single-Chain Antigen-Binding Proteins,”Science 242:423-426)描述了在一个可变区的羧基端和另一个可变区的氨基端之间桥接了约3.5nm的连接肽的实例。已设计并使用

了其他序列的接头(Bird等人(1988)“Single-Chain Antigen-Binding Proteins,” Science 242:423-426)。为了另外的功能,例如,连接药物或连接至固体支持体,可进而对接头进行修饰。单链变体可通过重组或合成产生。对于scFv的合成生产,可使用自动合成仪。对于scFv的重组生产,可将包含编码该scFv的多核苷酸的合适质粒引入到合适的宿主细胞,例如真核细胞,例如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞,或原核细胞例如大肠杆菌(E.coli.)。编码目的scFv的多核苷酸可通过常规操作例如连接多核苷酸来制备。可使用本领域已知的标准蛋白质纯化技术分离所得的scFv。

[0180] 本发明包括对结合B7-H3的抗体和多肽和B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂的修饰,包括不明显影响其特性的功能上等效的抗体和多肽和具有增强或降低的活性的变体的修饰。多肽的修饰是本领域常规的做法且本文不必详细描述。修饰过的多肽的实例包括不明显有害地改变功能活性或化学类似物的用途的具有保守氨基酸残基置换、一个或多个氨基酸的缺失或添加的多肽。可被相互保守置换的氨基酸残基包括但不限于:甘氨酸/丙氨酸;缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸;天冬酰胺/谷氨酰胺;天冬氨酸/谷氨酸;丝氨酸/苏氨酸;赖氨酸/精氨酸;和苯丙氨酸/酪氨酸。这些多肽还包括糖基化和未糖基化的多肽,以及具有其他转录后修饰,诸如例如,使用不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化的多肽。优选地,氨基酸置换将是保守的,即,取代的氨基酸将具有与原始氨基酸的化学性质相似的化学性质。这些保守置换是本领域已知的,且以上已提供了实例。氨基酸修饰范围可从改变或修饰一个或多个氨基酸至一个区域例如可变区的完全重新设计。可变区的变化可改变结合亲和力和/或特异性。其他修饰方法包括使用本领域已知的偶联技术,包括但不限于酶学手段、氧化型置换和螯合。修饰可被用于例如连接用于免疫测定的标签,例如连接用于放射免疫测定的放射性部分。使用本领域建立的方法制备修饰过的多肽,且可使用本领域已知的标准测定筛选这些多肽。

[0181] 本发明还包括包含来自本发明的多肽和抗体的一个或多个片段或区域的融合蛋白。在一个实施方式中,提供了包含轻链可变区的至少10个连续氨基酸和重链可变区的至少10个氨基酸的融合多肽。在另一个实施方式中,融合多肽包含异源免疫球蛋白的恒定区。在另一个实施方式中,融合多肽包含由公开保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。为了本发明的目的,抗体融合蛋白包含特异性结合B7-H3的一个或多个多肽结构域和在天然分子中其未连接的另一氨基酸序列,例如来自另一个区域的异源序列或同源序列。

[0182] 抗B7-H3多肽和其他B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂可通过本领域已知的方法,例如通过合成或重组制备。产生B7-H3肽激动剂、拮抗剂和调节剂的一种方法包括化学合成该多肽,然后在适合获得天然构型,也就是,正确的二硫键连接的氧化条件下处理。这可使用本领域技术人员熟知的方法学实现(参见,例如,Kelley,R.F.等人(1990)在:Genetic Engineering Principles and Methods,Setlow,J.K.Ed.,Plenum Press,N.Y.,第12卷,第1-19页中;Stewart,J.M等人(1984)Solid Phase Peptide Synthesis,Pierce Chemical Co.,Rockford,IL;还参见美国专利第4,105,603;3,972,859;3,842,067;和3,862,925号)。

[0183] 本发明的肽可常规地使用固相肽合成法制备(Merrifield,B.(1986)“Solid Phase Synthesis,”Science 232(4748):341-347;Houghten,R.A.(1985)“General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides:Specificity

Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)82(15):5131-5135;Ganesan,A.(2006)"Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century,"Mini Rev.Med.Chem.6(1):3-10)。

[0184] 还在另一种替代方案中,完整的人抗体可通过使用已被构建成表达特定人免疫球蛋白蛋白质的商购小鼠来获得。被设计成产生更期望(例如,完整的人抗体)或更强健的免疫反应的转基因动物还可用于产生人源化抗体或人抗体。该技术的实例是XENOMOUSE™(Abgenix,Inc.,Fremont,CA)及HUMAB-MOUSE®和TC MOUSE™(都来自Medarex,Inc.,Princeton,NJ)。

[0185] 在替代方案中,抗体可通过重组制备并使用本领域已知的任何方法表达。可通过先分离由宿主动物制备的抗体,获得基因序列,并使用该基因序列在宿主细胞(例如,CHO细胞)中重组表达抗体来通过重组制备抗体。可采用的另一种方法是在植物(例如,烟草)或转基因奶中表达抗体序列。已公开了用于在植物或奶中重组表达抗体的合适方法(参见,例如,Peeters等人(2001)"Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants,"Vaccine 19:2756;Lonberg,N.等人(1995)"Human Antibodies From Transgenic Mice,"Int.Rev.Immunol 13:65-93;和Pollock等人(1999)"Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies,"J.Immunol Methods 231:147-157)。制备抗体衍生物例如人源化的抗体、单链抗体等的合适方法是本领域已知的。在另一种替代方案中,抗体可通过噬菌体展示技术重组制备(参见,例如美国专利第5,565,332;5,580,717;5,733,743;6,265,150号;和Winter,G.等人(1994)"Making Antibodies By Phage Display Technology,"Annu.Rev.Immunol.12.433-455)。

[0186] 可通过本领域技术人员熟知的Edman降解法对目的抗体或蛋白质进行测序。可使用从质谱或Edman降解产生的肽信息设计用来克隆目的蛋白质的探针或引物。

[0187] 克隆目的蛋白质的替代方法是通过使用纯化的B7-H3或其部分来"淘选"表达目的抗体或蛋白质的细胞。B7-H3以"2Ig"形式和"4Ig"形式存在。人B7-H3的"2Ig"形式的氨基酸序列是(SEQ ID NO:1):

[0188]

MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEGSKTALQ
PLKHSDSKED DGQEIA

[0189] 编码人B7-H3的"2Ig"形式的cDNA序列是(SEQ ID NO:2):

[0190]

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg
gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg
gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag
cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt
gcactgctgg tggccctggc tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag
gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag
cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc

[0191] 人B7-H3的“2Ig”形式的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)(下文以加粗并加下划线方式示出)完全包括在人B7-H3的“4Ig”形式内(SEQ ID NO:76)：

[0192]

MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG

[0193]

LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAV**EVQ**
VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDGQ
GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEEN
AGAEDQDGEG EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA

[0194] 编码人B7-H3的“4Ig”形式的cDNA序列是(SEQ ID NO:77)；以加粗并加下划线方式示出了编码B&-H3的“2Ig”形式的残基：

[0195]

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg
gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg
gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag
agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg
ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tcccccgagc ctggcttcag cctggcacag
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc
cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacaa
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgct gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac
tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc
atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt
gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg
cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg
acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg
ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat
gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cc

[0196] “淘选”方法可通过以下步骤进行:从表达B7-H3的组织或细胞获得cDNA文库,在第二种细胞类型中过表达该cDNA并筛选特异性结合B7-H3的第二种细胞类型的转染细胞。可在现有技术中找到通过“淘选”来克隆编码细胞表面蛋白的哺乳动物基因中使用的方法的详细描述(参见,例如,Aruffo,A.等人(1987)“Molecular Cloning Of A CD28cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)84:8573-8577和Stephan,J.等人(1999)“Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development:Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation,”Endocrinol.140:5841-5854)。

[0197] 编码抗B7-H3抗体和其他B7-H3肽激动剂、拮抗剂和调节剂的cDNA可通过根据本领域的标准方法反转录来自特定细胞类型的mRNA获得。具体地,mRNA可使用各种裂解酶或化学溶液根据Sambrook等人(同上)提供的方法分离或遵循厂家(例如,Qiagen,Invitrogen,Promega)提供的附随说明书用商购核酸结合树脂提取。然后将合成的cDNA引入到表达载体中以在第二种类型的细胞中产生目的抗体或蛋白质。这意味着作为游离体或作为染色体DNA的组成部分的表达载体在宿主细胞中必须是可复制的。合适的表达载体包括但不限于质粒、包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒的病毒载体和黏端质粒。

[0198] 可通过许多合适的手段中的任何一种将包含目的多核苷酸的载体引入宿主细胞,包括电穿孔法、使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质转染;基因枪转化法;脂质体转染;和感染(例如,当载体是致病原例如牛痘病毒时)。引入载体或多核苷酸的选择

将经常取决于宿主细胞的特征。

[0199] 能够过表达异源DNA的任何宿主细胞可用于分离编码目的抗体、多肽或蛋白质的基因的目的。合适的哺乳动物宿主细胞的非限制性实例包括但不限于COS、HeLa和CHO细胞。优选地，与宿主细胞中相应内源目的抗体或蛋白质(如果存在的话)的表达水平相比，宿主细胞以高出约5倍，更优选地高出10倍，甚至更优选地高出20倍的水平表达cDNA。特异性结合B7-H3的宿主细胞的筛选通过免疫测定或FACS实现。可鉴定到过表达目的抗体或蛋白质的细胞。

[0200] 现在可被利用以产生编码所得蛋白质相对于亲本B7-H3肽激动剂、拮抗剂或调节剂的添加、缺失或氨基酸序列变化的突变B7-H3肽激动剂、拮抗剂和调节剂的多种技术也是可获得的。

[0201] 本发明包括包含本发明的抗体的氨基酸序列的多肽。可使用本领域已知的方法制备本发明的多肽。可通过抗体的蛋白酶解或其他降解，通过上述重组方法(即，单一或融合多肽)或通过化学合成产生多肽。通常通过化学合成制备抗体的多肽，尤其是多达约50个氨基酸的较短的多肽。化学合成的方法是本领域已知的并且是商购的。例如，可通过自动多肽合成仪使用固相方法产生抗B7-H3多肽。

[0202] IV.用于筛选多肽和单克隆抗体的方法

[0203] 多种方法可用来筛选结合B7-H3的多肽和单克隆抗体。应理解“结合”是指生物学或免疫学上有关的特异性结合，而不是指例如当针对非特异性的靶以非常高的浓度使用免疫球蛋白时可能发生的非特异性结合。在一个实施方式中，使用标准筛选技术筛选结合B7-H3的单克隆抗体。以这种方式获得了抗B7-H3单克隆抗体。本发明的优选杂交瘤是产生抗体BRCA69D、BRCA84D或PRCA157的杂交瘤。

[0204] 可鉴定到结合B7-H3的另外的单克隆抗体。为了该目的，根据其结合癌组织而不结合非癌性细胞的差异化能力来筛选单克隆抗体。在一个实施方式中，选择到结合B7-H3并还与人的癌性细胞或组织交叉反应但不在相同程度上与正常细胞或组织交叉反应的单克隆抗体。可被用于筛选的一种方法是免疫组织化学(IHC)。标准的免疫组织化学技术是本领域普通技术人员已知的。参见，例如，Animal Cell Culture Methods(J.P.Mather和D.Barnes，编辑，Academic Press，NY，第57卷，第18和19章，第314-350页，1998)。生物样品(例如，组织)可从活组织检查、尸体解剖或尸体剖检获得。为了确定B7-H3是否只存在于癌性细胞上，可使用抗B7-H3抗体检测B7-H3在来自患癌症的个体的组织上的存在，而来自患癌症的该个体的其他非癌性组织或来自未患癌症的个体的组织用作对照。可将组织包埋到防止冷冻期间的损坏的固体或半固体物质中(例如，琼脂糖凝胶或OCT)并然后切片以染色。来自不同器官和处于不同级别的癌症可用来筛选单克隆抗体。可用于筛选目的的组织的实例包括但不限于卵巢、乳房、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、脑、心脏、肝、胃、神经、血管、骨、上消化道和胰。可用于筛选目的的不同癌症类型的实例包括但不限于癌、腺癌、肉瘤、腺肉瘤、淋巴瘤和白血病。

[0205] 又在另一替代方案中，癌性细胞系例如HMEC(BioWhittaker CC-2251)、HUVEC(原代内皮细胞)、BT-474(ATCC#HTB-20)、MCF7(ATCC#HTB22)、MDA-MB-175-VII(ATCC#HB-25)、MDA-MB-361(ATCC#HB-27)、SKBR3(ATCC#HTB-30)、A549(ATCC#CCL-185)、Calu-3(ATCC#HTB-55)、SKMES-I(ATCC#HTB-58)、ES-2(ATCC#CRL-1978)、SKOV3(ATCC#HTB-77)、Panc-1(ATCC#

CRL-1469)、AsPC-I(ATCC#CRL-1682)、HPAF-II(ATCC#CRL-1997)、Hs700T(ATCC#HTB-174)、Colo205(ATCC#CCL-222)、HT-29(ATCC#HTB-38)、SW480(ATCC#CCL-228)、SW948(ATCC#CCL-237)、293(ATCC#CRL-1573)、786-O(ATCC#CRL-1932)、A498(ATCC#HTB-44)、Caki-2(ATCC#HTB-47)、COS-7(ATCC#CRL-1651)、RL-65(ATCC#CRL-10345)、SV-T2(ATCC#CCL-163.1)、22RV1(ATCC#CRL-2505)、DU145(ATCC#HTB-81)、LNCaP(ATCC#CRL-1740)、PC-3(ATCC#CRL-1435)、HT29(ATCC#HTB-38)、Hs746T(ATCC#HTB-135)、NCI-N87(ATCC#CRL-5822)和来自其相应组织的正常细胞可用来筛选特异性针对癌性组织的单克隆抗体。来源于不同器官(包括但不限于肾、卵巢、乳房、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、主动脉平滑肌和内皮细胞)的正常组织的原代或低传代的细胞培养物可用作阴性对照。癌性或非癌性细胞可在载玻片或盖玻片或在塑料表面上生长,或在如WO 01/43869中所述的CellArray™装置中制备并使用以上对组织描述的IHC根据抗体的结合来筛选。可选择地,可使用非蛋白水解的手段从生长表面上取出细胞并离心成沉淀,然后将该沉淀作为组织包埋并处理用于上述IHC分析。可将细胞接种到免疫缺陷的动物体内,允许生长成肿瘤,并然后收集该肿瘤,包埋并用作IHC分析的组织来源。在另一种替代方案中,可通过与一抗一起孵育连接至荧光分子的"报告"二抗来筛选单细胞并然后使用荧光激活细胞分选(FACS)设备分析。

[0206] 可使用多种不同的检测系统中的任何一种检测抗体与组织切片的结合。通常,免疫组织化学包括一抗与组织的结合且然后产生对来自一抗的物质反应的二抗并将二抗偶联到可检测标志(例如,辣根过氧化物酶,HRP,或二氨基联苯胺,DAB)上。可使用的一种替代方法是多克隆镜像互补的抗体或polyMICA™(多克隆镜像互补的抗体;The Binding Site Limited,Birmingham,UK;Mangham,D.C.等人(1999)"A Novel Immunohistochemical Detection System Using Mirror Image Complementary Antibodies(MICA),"Histopathology 35(2):129-33)。PoIyMICA™技术可用来测试一抗(例如,抗B7-H3抗体)与正常组织和癌性组织的结合。多种类型的PoIyMICA™检测试剂盒是商购的:产品编号HK004.D是使用DAB发色团的polyMICA™检测试剂盒;产品编号HK004.A是使用AEC发色团的polyMICA™检测试剂盒。可选择地,可用可检测标志直接标记一抗。

[0207] 为筛选合适的抗体的IHC筛选中的第一步骤是小鼠中产生的一抗(例如,抗B7-H3抗体)与一种或多种免疫原(例如,细胞或组织样品)的结合。在一个实施方式中,组织样品是来自不同器官的冷冻组织的切片。所述细胞或组织样品可以是癌性或非癌性的。

[0208] 可制备冷冻组织,将其经固定或不经固定地切片并通过熟悉本领域的人员已知的几种方法中的任何一种进行IHC(参见,例如Stephan等人(1999)"Distribution And Function Of The Adhesion Molecule BEN During Rat Development,"Dev.Biol.212:264-277和Stephan等人(1999)"Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development:Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation,"Endocrinology 140:5841-5854)。

[0209] V.表征抗B7-H3抗体的方法

[0210] 可使用多种方法中的任何一种来表征抗B7-H3抗体。一种方法是鉴定其结合的表位。表位作图是可从各种来源商购的,例如Pepscan Systems(Lelystad,The Netherlands)。表位作图可用来确定抗B7-H3抗体结合的序列。表位可以是线性表位,即,包含在单串氨基酸中或可以是由可能不一定包含在单串中的氨基酸的三维相互作用形成的

构象表位。

[0211] 可分离或合成(例如,通过重组)不同长度(例如,优选地,至少4-6个氨基酸长)的肽并用于抗B7-H3抗体的结合测定。可通过使用衍生自胞外序列的重叠肽并测定抗B7-H3抗体的结合而在系统筛选中确定抗B7-H3抗体结合的表位。

[0212] 可用来表征抗B7-H3抗体的又一种方法是利用竞争测定,使用已知结合相同抗原,即,B7-H3的其他抗体,来确定抗B7-H3抗体是否与其他抗体结合相同的表位。商购的针对B7-H3的抗体的实例可能是可用的并可使用本文教导的结合测定鉴定。竞争测定是本领域技术人员熟知的,并在实施例中进一步详述了这些方法和示出的数据。抗B7-H3抗体还可由其结合的组织、癌症类型或肿瘤类型进一步表征。

[0213] 另一种表征抗B7-H3抗体的方法是通过其结合的抗原。将抗B7-H3抗体与来自各种人类癌症的细胞裂解液一起用于蛋白质印迹中。如本领域技术人员已知的,蛋白质印迹可包括在变性或非变性凝胶上对细胞裂解液和/或细胞级分进行电泳,将蛋白质转移到硝酸纤维素纸上,并然后用抗体(例如,抗B7-H3抗体)探测印迹以观察该抗体结合哪些蛋白质。B7-H3与不同组织(包括但不限于结肠、乳房、卵巢、胰和肺)的各种人类癌症有关。

[0214] VI.使用抗B7-H3抗体和B7-H3调节剂诊断癌症的方法

[0215] 为了诊断目的,通过本文公开的方法制备的针对B7-H3的单克隆抗体可用来确定多种组织(包括但不限于卵巢、乳房、肺、前列腺、结肠、肾、胰、皮肤、甲状腺、脑、心脏、肝、胃、神经、血管、骨骼、和上消化道)中存在或不存在癌性细胞。通过本文公开的方法制备的针对B7-H3的抗体还可用来确定在其从实体瘤中释放之后循环在血液中的癌性细胞的存在或不存在或其水平。这些循环的抗原可以是完整的B7-H3抗原,或其保留了根据本文教导的方法可被检测到的能力的片段。这种检测可使用本领域通常使用的标准方法通过FACS分析实现。

[0216] 这些用途可包括在B7-H3和特异性结合B7-H3的抗体之间形成复合物。这些抗体的实例包括但不限于由杂交瘤BRCA84D、BRCA69D和PRCA157产生的抗B7-H3单克隆抗体。该复合物可在体外或体内形成。不被理论束缚地,单克隆抗体抗B7-H3可通过B7-H3的胞外域与B7-H3结合且然后可被内化。

[0217] 在本发明的诊断方法的优选实施方式中,抗体带有可检测标签。可使用的标签的实例包括放射剂或荧光团,例如藻红蛋白或异硫氰酸荧光素(也称作荧光异硫氰酸酯或FITC)。

[0218] 与商业上用于诊断和治疗目的的其他已知抗体一样,本发明的靶抗原广泛表达在正常组织中。在某些肿瘤中其还被上调。因此,用于诊断剂或治疗剂的本发明的抗体的具体剂量和递送途径将根据所处理的特定肿瘤或疾病状态以及待治疗的特定个体来调整。

[0219] 为了诊断使用这些抗体的一种方法是通过将该抗体连接到放射剂或不透射线剂上,对个体施用该抗体并使用X-射线或其他成像设备显示标记的抗体在表达抗原的癌细胞表面上的位置的体内肿瘤成像。以促进在生理条件下的结合的浓度施用抗体。

[0220] 用于检测B7-H3的体外技术是本领域中常用的,且包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀、免疫荧光、酶免疫测定(EIA)、放射免疫测定(RIA)和蛋白质印迹分析。

[0221] 在本发明的方面中,对肿瘤或赘生物进行放射成像或测量用放射标记的抗体进行治疗的方法的有效性的方法包括根据本发明的实践对个体施用放射标记的、肿瘤特异性抗

体的步骤。放射标记的抗体可以是包含优选地选自由锝-99m、铟-111、碘-131、铼-186、铼-188、钐-153、镥-177、铜-64、钪-47、钇-90组成的组的放射标记的单克隆或多克隆抗体。标记有治疗性放射性核素例如碘-131、铼-188、钬-166、钐-153和钪-47的不损害抗体的免疫反应性且不被体内分解的单克隆抗体是特别优选的。本领域技术人员将理解其他放射性同位素是已知的，且可适合用于特定应用。放射成像可使用单光子发射计算机断层成像(SPECT)、正电子成像术(PET)、计算机断层摄影(CT)或核磁共振成像(MRI)进行。还设想了允许通过放射免疫成像定位的转移位置的更多解剖学界定的相关成像。

[0222] 在其他方法中，取出癌性细胞并通过本领域熟知的方法(例如，包埋到冷冻化合物中，冷冻并经固定或不经固定地切片；经过或不经抗原修复的多种方法来进行固定和石蜡包埋并复染)制备用于免疫组织化学的组织。单克隆抗体还可用来鉴定不同发育阶段的癌细胞。这些抗体还可用来确定哪些个体的肿瘤在其表面上以预定的水平表达抗原且因此成为使用针对所述抗原定位的抗体进行免疫治疗的候选者。抗体可识别表达B7-H3的原发和转移性癌症。如本文所用的，检测可包括定性和/或定量检测且可包括将所测量的水平与正常细胞对比以获得B7-H3在癌性细胞中的增加的表达水平。

[0223] 使用结合B7-H3的任何抗体和可用来确定B7-H3的表达水平的任何其他方法，本发明还提供了帮助诊断癌症的方法，所述癌症通过个体内表达B7-H3的癌细胞表征。如本文所用的，用于“帮助诊断”的方法是指这些方法有助于进行有关癌症的分类或性质的临床确定，且关于确定性诊断可能或可能不是论断性的。因此，帮助诊断癌症的方法可包括检测B7-H3在来自个体的生物样品中的水平和/或确定B7-H3在样品中的表达水平的步骤。识别抗原或其部分的抗体还可用来进行诊断性免疫测定以检测由存活或死亡的癌细胞释放或分泌到体液(包括但不限于血液、唾液、尿液、肺液或腹水)中的抗原。

[0224] 并不是特定的目的肿瘤中的所有细胞都将表达B7-H3，且其他组织中的癌性细胞可能表达B7-H3，因此应筛选个体的癌性细胞上存在或不存在B7-H3以确定免疫治疗在该个体内的有用性。通过本文公开的方法制备的抗B7-H3抗体可用来确定被诊断患癌症的个体是否可以被认定为使用针对B7-H3定位的抗体的免疫治疗的候选者。在一个实施方式中，可使用针对B7-H3定位的抗体检测癌性肿瘤或活组织检查样品的B7-H3表达。具有表达B7-H3的癌细胞的个体是使用针对B7-H3定位的抗体的免疫治疗的合适候选者。用抗B7-H3抗体染色还可用来区分癌性组织和正常组织。

[0225] 对于确定哪些肿瘤最有可能对特定治疗响应，对患癌症的个体的预后，肿瘤的亚型或转移性疾病的起源和疾病的进展或对治疗的反应，使用抗B7-H3抗体用于诊断目的的方法在任何形式的抗癌治疗例如，化疗或放射治疗之前或之后都是有用的。

[0226] 本发明的组合物还适合使用以上概述的方法应用于其他患病(非癌性)细胞来诊断除了癌症以外的病态。适合用于本发明的方法中的病态包括但不限于与个体的炎症或自身免疫反应有关的疾病或紊乱。上述方法可用于调控个体的炎症或自身免疫反应。示例性而非限制性地，可使用本发明的组合物和方法进行诊断和/或治疗的由炎症和自身免疫紊乱造成的疾病和病症包括多发性硬化、脑膜炎、脑炎、中风、其他脑创伤、炎性肠病(包括溃疡性结肠炎和克罗氏病)、重症肌无力、狼疮、类风湿关节炎、哮喘、急性青少年诱发型糖尿病、AIDS痴呆、动脉粥样硬化、肾炎、视网膜炎、过敏性皮炎、银屑病、心肌缺血和急性白细胞介导的肺损伤。

[0227] 本发明的抗体和其他治疗剂诊断和/或治疗用途的其他适应症包括对处于器官或移植物排斥风险之中的个体施用。近些年来，在关于移植组织和器官例如皮肤、肾、肝、心脏、肺、胰和骨髓的手术技术的效率方面已有极大的提高。可能主要突显的问题是缺乏用于在接受体内诱导对移植的同种异体移植物或器官的免疫耐受的满意的剂。当将同种异体细胞或器官移植到宿主体内(即，供体和受体是来自同一种类的不同个体)，宿主免疫系统可能引发对移植物中的外来抗原的免疫反应(宿主抗移植物疾病)，造成移植组织的破坏。

[0228] 本申请任何地方描述的抗B7-H3抗体的用途还包括本文所述的其他B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂的用途。在这些实施方式中，B7-H3激动剂、拮抗剂和其他非抗体调节剂在所述步骤中替换B7-H3抗体，并进行普通的技术从业者范围内的改变以将该方法调整成适应替换的B7-H3调节组合物。

[0229] 通过本文公开的方法制备的针对B7-H3的单克隆抗体可用来确定人类癌症干细胞在多种组织中的存在或不存在。已假设癌症干细胞(CSC)在肿瘤生长和转移中起作用(Ghotra,V.P.等人(2009)“The Cancer Stem Cell Microenvironment And Anti-Cancer Therapy,”Int.J.Radiat.Biol.85(11):955-962;Gupta,P.B.等人(2009)“Cancer Stem Cells:Mirage Or Reality?”Nat.Med.15(9):1010-1012;Lawson,J.C.等人(2009)“Cancer Stem Cells In Breast Cancer And Metastasis,”Breast Cancer Res.Treat.118(2):241-254;Hermann,P.C.等人(2009)“Pancreatic Cancer Stem Cells--Insights And Perspectives,”Expert Opin.Biol.Ther.9(10):1271-1278;Schatton,T.等人(2009)“Identification And Targeting Of Cancer Stem Cells,”Bioessays 31(10):1038-1049;Mittal,S.等人(2009)“Cancer Stem Cells:The Other Face Of Janus,”Amer.J.Med.Sci.338(2):107-112;Alison,M.R.等人(2009)“Stem Cells And Lung Cancer:Future Therapeutic Targets?”Expert Opin.Biol.Ther.9(9):1127-1141;Charafe-Jauffret,E.等人(2009)“Breast Cancer Stem Cells:Tools And Models To Rely On,”BMC Cancer 9:202;Scopelliti,A.等人(2009)“Therapeutic Implications Of Cancer Initiating Cells,”Expert Opin.Biol.Ther.9(8):1005-1016;PCT公布WO 2008/091908)。根据该假设，CSC在每种肿瘤内提供了能够无限期自我更新并发育成更多的在复制能力方面相对有限的成体肿瘤细胞的一小组独特的细胞。已假设这些癌症干细胞可能更能抵抗化疗剂、放射或其他毒性条件，且因此在临床治疗之后仍存活且后来长成继发性肿瘤、转移或造成复发。已表明CSC可从‘正常’组织干细胞或从更加分化的组织祖细胞产生。

[0230] 人类癌性干细胞具有多种确定的特征。PCT公布WO 2008/091908中描述了这些特征且在此通过引用并入。针对癌症干细胞上的细胞表面靶的单克隆抗体可用来确定癌症干细胞在多种组织中的存在或不存在。通过本文公开的方法制备的针对B7-H3的单克隆抗体还可用来确定癌症干细胞的存在或不存在或癌症干细胞在样品或组织中或从实体瘤中释放之后在血液循环中的水平。这种循环的抗原可以是完整的B7-H3抗原，或是保留根据本文教导的方法检测的能力的片段。这种检测可使用本领域通常使用的标准方法通过FACS分析实现。在另一个实施方式中，这种检测可使用本领域通常使用的标准方法通过组织样品的免疫组织化学分析实现。

[0231] 这些用途可包括在B7-H3和特异性结合癌症干细胞上的B7-H3的抗体之间形成复合物。这些抗体的实例包括但不限于由杂交瘤BRCA84D、BRCA69D和PRCA157产生的那些抗

B7-H3单克隆抗体。该复合物可以体外或体内形成。

[0232] 提及它们用于抗B7-H3抗体的用途的本申请中描述的用途还包括本文所述的其他B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂用于癌症干细胞的鉴定和治疗的用途。在这些实施方式中，使用与所述方法相似的方法使用抗B7-H3抗体和其他B7-H3激动剂、拮抗剂和调节剂用于癌症干细胞的鉴定、诊断或治疗性治疗，并进行普通的技术从业者范围内的改变以将该方法调整成适合鉴定/诊断或治疗癌症干细胞。

[0233] VII.本发明的优选组合物

[0234] 本发明包括组合物，包括包含抗B7-H3抗体、衍生自抗B7-H3抗体的多肽、包含编码抗B7-H3抗体的序列的多核苷酸和本文所述的其他剂的药物组合物。如本文所用的，组合物还包含结合B7-H3的一种或多种抗体、多肽和蛋白质、B7-H3激动剂、拮抗剂、调节剂，和/或包含编码结合B7-H3的一种或多种抗体、多肽和蛋白质的序列的一种或多种多核苷酸。

[0235] 本发明还提供了任何B7-H3肽激动剂、拮抗剂或调节剂的偶联物和支持特定B7-H3肽激动剂、拮抗剂或调节剂的期望的一种功能或多种功能的其他化学结构。

[0236] 这些偶联物包括共价结合本文讨论的诊断、筛选或纯化方法中使用的大分子例如任何不溶性的固体支持基质的B7-H3肽激动剂、拮抗剂或调节剂。可溶性基质材料包括化学上惰性，具有高的孔隙度并具有大量的能够与肽配体形成共价键的官能团的任何物质。在Dean等人(编辑)Affinity Chromatography:A Practical Approach,IRL Press(1985);Lowe,“An Introduction to Affinity Chromatography”,在Work等人(编辑)Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,第7卷,部分II,North-Holland(1979);Porath等人,“Biospecific Affinity Chromatography”,在Neurath,H.等人(编辑),The Proteins,第3版,第1卷,第95-178页(1975);和Schott,H.Affinity Chromatography,Macel Dekker,Inc.NY(1984)中描述了基质材料和用于制备基质-配体的偶联物的方法的实例。

[0237] 本文还提供了B7-H3肽激动剂、拮抗剂或调节剂与用于本文讨论的诊断方法中的任何报告部分的偶联物。还通过下列标准中的任何(一种或多种)鉴定并表征了本发明的B7-H3肽激动剂、拮抗剂或调节剂、多肽和蛋白质，包括抗B7-H3抗体：

[0238] (a)特异性结合B7-H3(且特别是表达在包括但不限于肾、前列腺或肺的癌细胞的癌细胞表面上的B7-H3分子)的能力；

[0239] (b)竞争性抑制已知的抗B7-H3抗体优先结合B7-H3的能力，包括优先结合原始抗体优先结合的相同B7-H3表位的能力；

[0240] (c)体外或体内结合B7-H3的暴露于活细胞表面上的部分的能力；

[0241] (d)结合B7-H3的暴露于表达B7-H3的活的癌细胞表面上的部分的能力；

[0242] (e)将化疗剂递送至其表面上表达B7-H3的癌性细胞(例如，肾、前列腺或肺癌细胞)的能力；和/或

[0243] (f)将治疗剂或可检测标志递送至其表面上表达B7-H3的癌细胞(例如但不限于前列腺癌细胞)的能力。

[0244] 本发明的优选抗体将相对于正常的非癌性组织显示出对肿瘤组织的差异性IHC染色，且此外将能够在灵长类(且特别是食蟹猕猴)模型中测试抗体疗效。另外本发明的优选抗体将显示出期望的亲和力和抗原特异性水平。另外本发明的优选抗体将显示出期望的免疫调节活性和细胞内化水平。

[0245] 在某些实施方式中，本发明的抗体是由杂交瘤BRCA84D、BRCA69D或PRCA157或其后代产生的抗体。本发明还包括由这些保藏的杂交瘤产生的抗体和其等效抗体或多肽片段(例如Fab、Fab'、F(ab')2Fv、Fc等)、嵌合抗体、单链(ScFv)、突变体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、和这些抗体或包含具有所需特异性的抗原(B3-H7)识别位点的等效抗体中的任何一种的任何其他修饰的构型。本发明还提供了展现出抗B7-H3家族成员的一种或多种生物学特征的人类抗体。通过以上描述的五种标准中的任何(一种或多种)鉴定并表征了抗B7-H3家族的等效抗体(包括人源化抗体和人类抗体)、多肽片段和包含这些片段中的任何一种的多肽。PCT公布WO 2008/066691中提供了抗B7-H3抗体的鼠可变域和示例性的人源化的可变域的序列。示例性而非限制性地提供了这些序列，且不同的序列以及所提供的序列的片段和变体被包含在本发明的范围内。

[0246] 由于其相对于其他抗体的较为干净的正常组织IHC特征，较强的肿瘤/正常IHC差异，中到强的结合(BIACORE™)/IHC)、与食蟹猕猴的B7-H3的交叉反应性和对通用DART™分子("UDART™")的有效活性，BRCA84D、BRCA69D和PRCA157是本发明的优选的B7-H3抗体。在特别优选的实施方式中，本发明包括这些优选抗体的嵌合和人源化变体以及具有下述修饰的Fc区域的这些优选抗体的天然的和嵌合的及人源化的变体。另外本发明包括具有这些抗体的表位结合区域，特别是与结合T细胞受体、NKG2D受体或肿瘤相关抗原或半抗原例如荧光素(例如异硫氰酸荧光素(也称为荧光异硫氰酸酯或FITC)的表位结合区域一致的表位结合区域的DART™分子。

[0247] 在某些实施方式中，结合B7-H3的本发明的抗体、多肽和蛋白质是竞争性抑制本文指出的抗B7-H3抗体与B7-H3的优先结合的抗体、多肽和蛋白质。在某些实施方式中，这些抗体、多肽和蛋白质优先结合B7-H3上与抗体小鼠抗B7-H3优先结合的表位相同的表位。

[0248] 因此，本发明提供了以下任何一种(或包含以下任一种的组合物，包括药物组合物)：(a)由具有以上指出的保藏编号的宿主细胞或其子代产生的抗体；(b)该抗体的人源化形式；(c)包含该抗体的一个或多个轻链和/或重链可变区的抗体；(d)包含与该抗体的重链和轻链的可变区同源或从其衍生的可变区和与人类抗体的重链和轻链的恒定区同源或从其衍生的恒定区的嵌合抗体；(e)包含该抗体的一个或多个轻链和/或重链CDR(至少一、二、三、四、五或六个)的抗体；(f)包含该抗体的重链和/或轻链的人类抗体；(g)与该抗体等效的人类抗体。该抗体的人源化形式可以或可以不具有与该原始抗体或由具有以上指出的保藏编号的宿主细胞产生的抗体相同的CDR。CDR区域的确定是本领域技术内熟知的。在某些实施方式中，本发明提供了包含与由一种以上指出的保藏的杂交瘤产生的抗体或由具有以上指出的保藏编号的宿主细胞产生的抗体的至少一个CDR、至少二个、至少三个、至少四个、至少5个CDR基本上同源(或，在某些实施方式中，与这些抗体中的一种的全部6个CDR基本同源或衍生自这些抗体中的一种)的至少一个CDR的抗体。其他实施方式包括具有与由本文指出的保藏的杂交瘤产生的抗体的至少二、三、四、五或六个CDR基本上同源或衍生自该抗体的至少二、三、四、五或六个CDR的抗体。应理解，为了本发明的目的，结合特异性和/或整体活性(其可依据将化疗剂递送到或进入癌性细胞以减少癌细胞的生长和/或增殖以在癌细胞内诱导凋亡性细胞死亡而延迟转移的形成和/或姑息治疗)通常被保持，但是活性程度与由保藏的杂交瘤细胞产生的抗体相比可变化(可更大或更小)。本发明还提供了制备这些抗体中的任何一种的方法。制备抗体的方法是本领域已知的并且在本文描述。

[0249] 本发明还提供了包含本发明的抗体的氨基酸序列的多肽。在某些实施方式中，多肽包含抗体的一个或多个轻链和/或重链可变区。在某些实施方式中，多肽包含抗体的一个或多个轻链和/或重链CDR。在某些实施方式中，多肽包含抗体的轻链和/或重链的三个CDR。在某些实施方式中，多肽包含具有下列任何一种的抗体氨基酸序列：原始抗体序列的至少5个连续氨基酸、至少8个连续氨基酸、至少约10个连续氨基酸、至少约15个连续氨基酸、至少约20个连续氨基酸、至少约25个连续氨基酸、至少约30个连续氨基酸，其中这些氨基酸中的至少3个来自抗体的可变区。在一个实施方式中，可变区来自原始抗体的轻链。在另一个实施方式中，可变区来自抗体的重链。在另一个实施方式中，5个(或更多个)连续氨基酸来自抗体的互补决定区(CDR)。

[0250] 在本发明的某些实施方式中，表达B7-H3、B7-H3的部分、抗B7-H3抗体或本发明的其他B7-H3结合多肽的本发明的细胞被直接施用到个体以调节B7-H3的体内生物活性。

[0251] 本发明的优选抗B7-H3抗体是BRCA84D、BRCA69D和PRCA157，所有这些抗体是对人B7-H3分子反应性的小鼠抗体。以下示出了BRCA84D、BRCA69D和PRCA157的可变轻链和可变重链以及每条链的各自CDR_1、CDR_2和CDR_3结构域的氨基酸序列和编码多核苷酸序列。因此本领域技术人员将能够构建具有这些CDR的能够结合被BRCA84D、BRCA69D和PRCA157识别的表位的抗体以及其衍生物。

[0252] A.BRCA84D的序列

[0253] (1)BRCA84D轻链序列

[0254] BRCA84D可变轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)：

[0255]

DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKP GQSPKALIYS ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTINNVQS EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGS GTKLEIK

[0256] 编码BRCA84D可变轻链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:4)：

[0257]

gacattgcga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag cctggtatca acagaaacca gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtct gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg gggacaaagt tggaaataaa a

[0258] BRCA84D可变轻链的CDR_1(SEQ ID NO:5)：KASQNVDTNVA

[0259] 编码BRCA84D可变轻链的CDR_1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:6)：aaggccagtc agaatgtgga tactaatgta gcc

[0260] BRCA84D可变轻链的CDR_2(SEQ ID NO:7)：SASYRYS

[0261] 编码BRCA84D可变轻链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:8)：tcggcatcct accggtacag t

[0262] BRCA84D可变轻链的CDR_3(SEQ ID NO:9)：QQYNNYPFT

[0263] 编码BRCA84D可变轻链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:10)：cagcaatata acaactatcc attcacg

[0264] (2)BRCA84D重链序列

[0265] BRCA84D可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:11)：

[0266]

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNTLF LQMTSLRSED TAMYYCGRGR ENIYYGSRLD YWGQGTTLTV SS

[0267] 编码BRCA84D可变重链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:12)：

[0268]

gatgtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg acagtagtgc catctactat gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc

[0269]

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca

[0270] BRCA84D可变重链的CDR_1(SEQ ID NO:13)：FGMH

[0271] 编码BRCA84D可变重链的CDR_1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:14)：tttggaatgcac

[0272] BRCA84D可变重链的CDR_2(SEQ ID NO:15)：YISSDSSAIYYADTVK

[0273] 编码BRCA84D可变重链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:16)：tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

[0274] BRCA84D可变重链的CDR_3(SEQ ID NO:17)：GRENIYYGSRLDY

[0275] 编码BRCA84D可变重链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:18)：gggagggaaa acatttacta cggtagtagg cttgactac

[0276] B.BRCA69D的序列

[0277] (1)BRCA69D轻链序列

[0278] BRCA69D可变轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:19)：

[0279]

DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTIDNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIK

[0280] 编码BRCA69D可变轻链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:20)：

[0281]

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcacgat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattgacaa cctggagcaa gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttcctccgac gttcggtgga ggcaccaaac tggaaatcaa a

[0282] BRCA69D可变轻链的CDR_1(SEQ ID NO:21)：RASQDISNYLN

[0283] 编码BRCA69D可变轻链的CDR_1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:22)：agggcaagtc aggacattag taattattta aac

[0284] BRCA69D可变轻链的CDR_2(SEQ ID NO:23)：YTSRLHS

[0285] 编码BRCA69D可变轻链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:24):tacacatcac gattacactc a

[0286] BRCA69D可变轻链的CDR_3(SEQ ID NO:25):QQGNTLPPT

[0287] 编码BRCA69D可变轻链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:26):caacagggta atacgcttcc tccgacg

[0288] (2)BRCA69D重链序列

[0289] BRCA69D可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:27):

[0290]

QVQLQQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR PGQGLEWIGT IYPGDGDTRY TQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARRG IPRLWYFDVW GAGTTVTVSS

[0291] 编码BRCA69D可变重链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:28):

[0292]

caggttcagc tccagcagtc tggggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaagttg tcctgcaagg cttctggcta cacctttact agctactgga tgcagtgggt aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattgggact atttatcctg gagatggtga tactaggtac actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac atgcaactca gcagcttggc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagaggg attccacggc tttggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca

[0293] BRCA69D可变重链的CDR_1(SEQ ID NO:29):SYWMQ

[0294] 编码BRCA69D可变重链的CDR_1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:30):agctactgga tgcag

[0295] BRCA69D可变重链的CDR_2(SEQ ID NO:31):TIYPGDGDTR YTQKFKG

[0296] 编码BRCA69D可变重链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:32):actatttatc ctggagatgg tgatactagg tacactcag aagttcaagg gc

[0297] BRCA69D可变重链的CDR_3(SEQ ID NO:33):RGIPRLWYFD V

[0298] 编码BRCA69D可变重链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:34):agagggattc cacggctttg gtacttcgat gtc

[0299] C.PRCA157的序列

[0300] (1)PRCA157轻链序列

[0301] PRCA157的可变轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:35):

[0302]

DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASESIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN TKTLPEGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGRYYCQH HYGTPPWTFG GGTNLEIK

[0303] 编码PRCA157可变轻链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:36):

[0304]

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga
aactgtcacc attacatgtc gagcaagtga gagtatttac agttatttag
catggtatca gcagaaacag ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat
acaaaaacct taccagaggg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc
aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct gaagattttg
ggagatatta ctgtcaacat cattatggta ctcctccgtg gacgttcggt
ggaggcacca acctggaaat caaa

[0305] PRCA157可变轻链的CDR_1(SEQ ID NO:37):RASESIYSYLA

[0306] 编码PRCA157可变轻链的CDR_1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:38):cgagcaagtg agagtattta cagttattta gca

[0307] PRCA157可变轻链的CDR_2(SEQ ID NO:39):NTKTLPE

[0308] 编码PRCA157可变轻链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:40):aatacaaaaa ccttaccaga g

[0309] PRCA157可变轻链的CDR_3(SEQ ID NO:41):QHHYGTPPW

[0310] 编码PRCA157可变轻链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:42):caacatcatt atggtactcc tccgtgg

[0311] (2)PRCA157重链序列

[0312] PRCA157的可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:43):

[0313]

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT
INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNTLY LQMRSLKSED TAMYYCARHD
GGAMDYWGQG TSVTVSS

[0314] 编码PRCA157可变重链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:44):

[0315]

gaggtgcagc aggtggagtc gggggggagac ttagtgaagc ctggagggtc
cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt tcctatggca
tgtcttgggt tcgccagact ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc
attaatagtg gtggaagtaa cacctactat ccagacagtt tgaaggggcg
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacccttac ctgcaaatgc
gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgac
gggggagcta tggactactg gggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc a

[0316] PRCA157可变重链的CDR_1(SEQ ID NO:45):SYGMS

[0317] 编码PRCA157可变重链的CDR_1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:46):tcctatggca tgtct

[0318] PRCA157可变重链的CDR_2(SEQ ID NO:47):VATINSGGSNTYYPDSLKG

[0319] 编码PRCA157可变重链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:48):gtcgcaacca ttaatagtgg tggaagtaac acctactatc cagacagttt gaagggg

[0320] PRCA157可变重链的CDR_3(SEQ ID NO:49):HDGGAMDY

[0321] 编码PRCA157可变重链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:50):catgacgggg gagctatgga ctac

[0322] D.Fc-改造的B7-H3抗体

[0323] 在常规的免疫功能中，抗体-抗原复合物与免疫系统的细胞的相互作用导致大量的反应，范围从效应功能例如抗体依赖的细胞毒性、肥大细胞脱粒和吞噬作用，到免疫调节信号例如调节淋巴细胞的增殖和抗体的分泌。所有这些相互作用通过抗体或免疫复合物的Fc结构域与造血细胞上专门的细胞表面受体的结合而引发。由抗体和免疫复合物引发的细胞反应的多样性由三种Fc受体：Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)的结构异质性产生。Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIA(CD32A)和Fc γ RIII(CD16)是活化型(即，免疫系统增强型)受体；Fc γ RIIB(CD32B)是抑制型(即，免疫系统抑制型)受体。以下示出了IgG1Fc区域的氨基酸序列(根据明确地通过引用并入本文且下文称为"Kabat EU"的Kabat等人，Sequence of Proteins of Immunological Interest，第5版Public Health Service，NIH，MD(1991)编号为SEQ ID NO:51)：

[0324] SEQ ID NO:51

[0325]

PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
230	240	250	260	270
DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP
280	290	300	310	320
APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV
330	340	350	360	370
EWESNGQPEN	NYKTTPPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH
380	390	400	410	420
EALHNHYTQK	SLSLSPGK			
430	440			

[0326] 残基230-341是Fc的CH2区域。残基342-447是Fc的CH3区域。

[0327] 本发明包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含在一个或多个部分具有一个或多个氨基酸修饰(例如，置换、缺失、插入)的变体Fc区域，这些修饰增强了变体Fc区域对Fc γ R(包括活化型和抑制型Fc γ R)的亲和力和亲合力。在某些实施方式中，所述一个或多个氨基酸修饰增强了变体Fc区域对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA的亲和力。在另一个实施方式中，变体Fc区域还以比相当的亲本抗体(即，除了Fc区域中的一个或多个氨基酸修饰，与本发明的抗体具有相同的氨基酸序列的抗体)的Fc区域结合Fc γ RIIB的亲和力低的亲和力特异性地结合Fc γ RIIB。在某些实施方式中，相对于亲本抗体，这些修饰增强了变体Fc区域对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA的亲和力且还增强了变体Fc区域对Fc γ RIIB的亲和力。在其他实施方式中，相对于亲本抗体的Fc区域，所述一个或多个氨基酸修饰增强了变体Fc区域对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA的亲和力但未改变变体Fc区域对Fc γ RIIB的亲和力。在另一个实施方式中，相对于亲本抗体，所述一个或多个氨基酸修饰增强了变体Fc区域对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA的亲和力但减弱了对Fc γ RIIB的亲和力。当在细胞中不能检测到亲本分子(没有修饰过的Fc区域)的结合活性时，增强的亲和力和/或亲合力在表达低水平的Fc γ R的细胞中导致可检测到的与Fc γ R或Fc γ R有关的结合活性。在其他实施方式中，修饰过的分子在以30,000至20,000分子/细胞的密度，以20,000至10,000分子/细胞的密度，以10,000至

5,000分子/细胞的密度,以5,000至1,000分子/细胞的密度,以1,000至200分子/细胞的密度或以200分子/细胞或更小的密度(但至少10、50、100或150分子/细胞)表达非FcγR受体靶抗原的细胞中显示出可检测到的结合。

[0328] 在另一个实施方式中,对Fc区域的氨基酸的所述一个或多个氨基酸修饰减弱了抗体对一种或多种FcγR受体的亲和力和亲合力。在特定的实施方式中,本发明包括包含变体Fc区域的抗体,其中相对于野生型Fc区域所述变体Fc区域包含至少一个氨基酸修饰,该变体Fc区域只结合一种FcγR,其中所述FcγR是FcγRIIIA。在另一个特定的实施方式中,本发明包括包含变体Fc区域的抗体,其中相对于野生型Fc区域所述变体Fc区域包含至少一个氨基酸修饰,该变体Fc区域只结合一种FcγR,其中所述FcγR是FcγRIIA。

[0329] 优选地,本发明的分子的结合特征通过用于确定一种或多种FcγR介导效应细胞功能的体外功能测定来表征(参见5.2.7部分)。可使用本领域已知的用于测定抗体-抗原或Fc-FcγR相互作用的体外测定(基于生化或免疫学的测定)来测定本发明的分子例如抗体对FcγR的亲和力和结合特性,即分别是抗原与抗体的特异性结合或Fc区域与FcγR的特异性结合,所述体外测定包括但不限于ELISA测定、表面等离子体共振测定、免疫沉淀测定。在最优选的实施方式中,在体内模型(例如本文描述并公开的模型)中本发明的分子具有与基于体外的测定中的结合特性相似的结合特性。然而,本发明不排除在基于体外的测定中未表现出期望的表型而在体内表现出期望的表型的本发明的分子。

[0330] 在某些实施方式中,包含变体Fc区域的本发明的分子在被定义为从氨基酸342-447延伸的Fc区域的CH3结构域中包含至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个氨基酸修饰)。在其他实施方式中,包含变体Fc区域的本发明的分子在被定义为从氨基酸231-341延伸的Fc区域的CH2结构域中包含至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个氨基酸修饰)。在某些实施方式中,本发明的分子包含至少两个氨基酸修饰(例如,具有2、3、4、5、6、7、8、9或更多个氨基酸修饰),其中至少一个修饰位于CH3区域且至少一个修饰在CH2区域。本发明还包括铰链区的氨基酸修饰。在特定的实施方式中,本发明包括被定义为从氨基酸216-230延伸的Fc区域的CH1结构域的氨基酸修饰。

[0331] 在特别优选的实施方式中,本发明包括包含变体Fc区域的分子,其中如使用本领域技术人员已知的并被本文例示的方法测量的,所述变体给予或具有增加的ADCC活性和/或增加的与FcγRIIA(CD32A)的结合。根据本发明的方法使用的ADCC测定可以是NK依赖性或巨噬细胞依赖性的。

[0332] 在特别优选的实施方式中,本发明包括包含变体Fc区域的分子,其中如使用本领域技术人员并被本文例示的方法测量的,所述变体给予或具有增加的ADCC活性和/或增加的与FcγRIIIA(CD3216A)的结合。根据本发明的方法使用的ADCC测定可以是NK依赖性或巨噬细胞依赖性的。

[0333] 本发明的Fc变体可与其他Fc修饰组合,所述Fc修饰例如在美国专利第7,632,497;7,521,542;7,425,619;7,416,727;7,371,826;7,355,008;7,335,742;7,332,581;7,183,387;7,122,637;和6,737,056号;在PCT公布第WO 2008/105886;WO 2008/002933;WO 2007/021841;WO 2007/106707;WO 06/088494;WO 05/115452;WO 05/110474;WO 04/1032269号;和在WO 04/063351中;和在Presta,L.G.等人(2002)“Engineering therapeutic antibodies for improved function,”Biochem.Soc.Trans.30(4):487-490;Shields,

R.L.等人(2002)“Lack of fucose on human IgG1N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity,”J.Biol.Chem.26;277(30):26733-26740和Shields,R.L.等人(2001)“High resolution mapping of the binding site on human IgG1for Fc gamma RI,Fc gamma RII,Fc gamma RIII,and FcRn and design of IgG1variants with improved binding to the Fc gamma R,”J.Biol.Chem.276(9):6591-6604)中公开的修饰。本发明包括将本发明的Fc变体与其他Fc修饰组合以为修饰过的抗体提供加合的、协同的或新型的特性。优选地,本发明的Fc变体增强了与其组合的修饰的表型。例如,如果本发明的Fc变体与已知以比相当的野生型Fc区域高的亲和力与FcγRIIIA结合的突变体组合,与本发明的突变体的组合导致FcγRIIIA亲和力的更高倍数的增强。

[0334] 本发明包括特异性结合B7-H3的抗体,该抗体包含变体Fc区域,其中相对于野生型Fc区域该变体Fc区域包含至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个氨基酸修饰),使得该分子相对于包含野生型Fc区域的分子具有增强的效应功能,条件是该变体Fc区域不仅仅具有以下位置的任何一种或多种置换或不仅仅是以下位置的任何一种或多种置换:243、255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438、439。在特定的实施方式中,本发明包括包含变体Fc区域的那些抗体,其中相对于野生型Fc区域该变体Fc区域包含至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个氨基酸修饰),使得该分子相对于包含野生型Fc区域的分子以改变的亲和力结合FcγR,条件是该变体Fc区域不仅仅具有以下位置的任何一种或多种置换或不仅仅是以下位置的任何一种或多种置换:243、255、258、267、269、270、276、278、280、283、285、289、292、293、294、295、296、300、303、305、307、309、320、322、329、332、331、337、338、340、373、376、416、419、434、435、437、438、439,且在位置256、290、298、312、326、333、334、359、360或430中的任何一个不具有丙氨酸;在位置268不具有天冬酰胺;在位置272不具有谷氨酰胺;在位置286不具有谷氨酰胺、丝氨酸或天冬氨酸;在位置290不具有丝氨酸;在位置301不具有甲硫氨酸;在位置320不具有甲硫氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或精氨酸;在位置322不具有谷氨酸;在位置326不具有天冬酰胺、丝氨酸、谷氨酸或天冬氨酸;在位置330不具有赖氨酸;在位置334不具有谷氨酰胺;在位置334不具有谷氨酸;在位置334不具有甲硫氨酸;在位置334不具有组氨酸;在位置334不具有缬氨酸;在位置334不具有亮氨酸;在位置335不具有谷氨酰胺;在位置335不具有赖氨酸;或在位置339不具有苏氨酸。

[0335] 本发明还包括特异性结合B7-H3的抗体,该抗体包含变体Fc区域,其中该变体Fc区域构成含有变体Fc区域的那些抗体,其中该变体Fc区域不仅仅具有以下位置的任何一种或多种置换或不仅仅是以下位置的任何一种或多种置换:268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、320、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438或439,且在位置280不具有组氨酸、谷氨酰胺或酪氨酸;在位置290不具有丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸或酪氨酸,在位置294不具有天冬酰胺,在位置295不具有赖氨酸;在位置296不具有脯氨酸;在位置298不具有脯氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸或缬氨酸;或在位置300不具有亮氨酸或异亮氨酸。在另一个实施方式中,本发明包括包

含变体Fc区域的那些抗体，其中相对于野生型Fc区域该变体Fc区域包含至少一个氨基酸修饰，使得该分子相对于包含野生型Fc区域的分子以降低的亲和力结合FcγR，条件是该变体Fc区域不仅仅具有以下位置的任何一种或多种置换或不仅仅是以下位置的任何一种或多种置换：243、252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438或439。又在另一个实施方式中，本发明包括包含变体Fc区域的那些抗体，其中相对于野生型Fc区域该变体Fc区域包含至少一个氨基酸修饰，使得该分子相对于包含野生型Fc区域的分子以增强的亲和力结合FcγR，条件是该变体Fc区域不仅仅具有以下位置的任何一种或多种置换或不仅仅是以下位置的任何一种或多种置换：280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398或430。

[0336] 本发明还包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含变体Fc区域，其中该变体Fc区域不仅仅包括以下位置的任何一种或多种置换或不仅仅是以下位置的任何一种或多种置换：330、243、247、298、241、240、244、263、262、235、269或328，且在位置243不具有亮氨酸，在位置298不具有天冬酰胺，在位置241不具有亮氨酸，且在位置240不具有异亮氨酸或丙氨酸，在位置244不具有组氨酸、在位置330不具有缬氨酸或在位置328不具有异亮氨酸。

[0337] 本发明特别地包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含具有增强的效应功能和/或改变的对活化型和/或抑制型受体的亲和力的变体Fc区域，其中所述变体Fc区域包含：(a)下列置换的任意1、2、3、4、5或6种：S239D、S298A、A330L、I332E、E333A或K334A；或(b)以下置换组合的任何一种：(1)S298A、E333A和K334A；(2)S239D和I332E；或(3)S239D、A330L和I332E。

[0338] 本发明特别地包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含具有增强的效应功能和/或改变的对活化型和/或抑制型受体的亲和力的变体Fc区域，其中所述变体Fc区域包含以下置换：

[0339] (1)在位置288被天冬酰胺置换，在位置330被丝氨酸置换并在位置396被亮氨酸置换；

[0340] (2)在位置334被谷氨酸置换，在位置359被天冬酰胺置换并在位置366被丝氨酸置换；

[0341] (3)在位置316被天冬氨酸置换，在位置378被缬氨酸胺置换并在位置399被谷氨酸置换；

[0342] (4)在位置247被亮氨酸置换，并在位置421被赖氨酸置换；

[0343] (5)在位置392被苏氨酸置换，并在位置396被亮氨酸置换；

[0344] (6)在位置221被谷氨酸置换，在位置270被谷氨酸置换，在位置308被丙氨酸置换，在位置311被组氨酸置换，在位置396被亮氨酸置换并在位置402被天冬氨酸置换；

[0345] (7)在位置419被组氨酸置换，并在位置396被亮氨酸置换；

[0346] (8)在位置240被丙氨酸置换，并在位置396被亮氨酸置换；

[0347] (9)在位置410被组氨酸置换，并在位置396被亮氨酸置换；

[0348] (10)在位置243被亮氨酸置换，在位置305被异亮氨酸置换，在位置378被天冬氨酸置换，在位置404被丝氨酸置换并在位置396被亮氨酸置换；

[0349] (11)在位置255被异亮氨酸置换，并在位置396被亮氨酸置换；

[0350] (12)在位置370被谷氨酸置换，并在位置396被亮氨酸置换；

[0351] (13)在位置270被谷氨酸置换，

[0352] 或

[0353] (14)以上(1)-(12)的置换的任意组合。

[0354] 在特定的实施方式中，本发明包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含含有以下置换的变体Fc区域：F243L、R292P和Y300L。在另一个特定的实施方式中，本发明包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含含有以下置换的变体Fc区域：L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。又在另一个特定的实施方式中，本发明包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含含有以下置换的变体Fc区域：F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L。

[0355] 在另一个特定的实施方式中，本发明包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含含有位置396处的亮氨酸置换、位置270处的谷氨酸置换和位置243处的亮氨酸置换的变体Fc区域。在另一个特定的实施方式中，该分子还包括一个或多个氨基酸修饰，例如本文公开的氨基酸修饰。

[0356] 本发明特别地包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含具有增强的效应功能和/或改变的对活化型和/或抑制型受体的亲和力的变体Fc区域，该变体Fc区域在下列位置中的一个或多个具有氨基酸修饰：119、125、132、133、141、142、147、149、162、166、185、192、202、205、210、214、215、216、217、218、219、221、222、223、224、225、227、229、231、232、233、235、240、241、242、243、244、246、247、248、250、251、252、253、254、255、256、258、261、262、263、268、269、270、272、274、275、276、279、280、281、282、284、287、288、289、290、291、292、293、295、298、301、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、315、316、317、318、319、320、323、326、327、328、330、333、334、335、337、339、340、343、344、345、347、348、352、353、354、355、358、359、360、361、362、365、366、367、369、370、371、372、375、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、404、406、407、408、409、410、411、412、414、415、416、417、419、420、421、422、423、424、427、428、431、433、435、436、438、440、441、442、443、446或447。优选地，这些突变产生了已被赋予效应细胞介导的功能并任选地具有如使用本文公开并例示且本领域技术人员已知的方法测定的对FcγR的改变的亲和力的分子。

[0357] 本发明特别地包括特异性结合B7-H3的抗体，该抗体包含具有增强的效应功能和/或改变的对活化型和/或抑制型受体的亲和力的变体Fc区域，该变体Fc区域具有：

[0358] (I)位于下列位置中的一个或多个的氨基酸修饰：(a)235、240、241、243、244、247、262、263、269、298、328或330和更优选地以下修饰中的一种或多种：V240A、V240I、F241L、F243L、P244H、S298N、L328I、A330V；其中相对于具有缺少该修饰的野生型Fc区域的抗体，这些抗体显示出改变的效应功能；

[0359] (II)位于下列位置中的一个或多个处的氨基酸修饰：268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438或439和更优选地以下修饰中的一种或多种：D280H、D280Q、D280Y、K290G、K290S、K290T、K290Y、E294N、Q295K、Y296P、S298D、S298N、S298P、S298V、Y300I、Y300L；其中相对于具有缺少该修饰的野生型Fc区域的抗体，这些抗体显示出改变的效应功能；

[0360] (III)位于下列位置中的一个或多个处的氨基酸修饰:255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438、439和更优选地以下修饰中的一种或多种:T256A、H268N、E272Q、N286D、N286Q、N286S、K290A、K290S、S298A、R301M、D312A、K320E、K320M、K320Q、K320R、K322E、K326A、K326D、K326E、K326N、K326S、A330K、A339T、E333A、K334A、K334E、K334H、K334L、K334M、K334Q、K334V、T335K、T335Q、T359A、K360A、E430A;其中相对于具有缺少该修饰的野生型Fc区域的抗体,这些抗体显示出改变的效应功能;

[0361] (IV)位于下列位置中的一个或多个处的氨基酸修饰:252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438或439;其中相对于具有缺少该修饰的野生型Fc区域的抗体,这些抗体显示出降低的效应功能;

[0362] (V)位于下列位置中的一个或多个处的氨基酸修饰:280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398或430;其中相对于具有缺少该修饰的野生型Fc区域的抗体,这些抗体显示出增强的效应功能;

[0363] 或

[0364] (VI)位于下列位置中的一个或多个处的氨基酸修饰:R255A、T256A、E258A、S267A、H268A、H268N、E272A、E272Q、N276A、D280A、E283A、H285A、N286A、N286D、N286Q、N286S、K290A、K290S、R301M、K320E、K320M、K320Q、K320R、K322E、K326A、K326D、K326E、K326S、A330K、P331A、T335Q、S337A、E430A;其中相对于具有缺少该修饰的野生型Fc区域的抗体,这些抗体显示出增强的效应功能。

[0365] 在其他实施方式中,本发明包括使用本领域已知的任何Fc变体例如,在下列文献中公开的Fc变体:Jefferis,B.J.等人(2002)“Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR:Current Models,”Immunol.Lett.82:57-65;Presta,L.G.等人(2002)“Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function,”Biochem.Soc.Trans.30:487-90;Idusogie,E.E.等人(2001)“Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement,”J.Immunol.166:2571-75;Shields,R.L.等人(2001)“High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1For Fc Gamma RI,Fc Gamma RII,Fc Gamma RIII,And FcRn And Design Of IgG1Variants With Improved Binding To The Fc gamma R,”J.Biol.Chem.276:6591-6604;Idusogie,E.E.等人(2000)“Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan,A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc,”J.Immunol.164:4178-84;Reddy,M.P.等人(2000)“Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4Monoclonal Antibody To Human CD4,”J.Immunol.164:1925-1933;Xu,D.等人(2000)“In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3Effector Function Variant Antibodies,”Cell.Immunol.200:16-26;Armour,K.L.等人(1999)“Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities,”Eur.J.Immunol.29:2613-24;Jefferis,R.等人(1996)“Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions,”

Immunol.Lett.54:101-04;Lund,J.等人(1996)“Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains,”J.Immunol.157:4963-4969;Hutchins等人(1995)“Improved Biodistribution,Tumor Targeting,And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4Variant Of Campath-1H,”Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)92:11980-84;Jefferis,R.等人(1995)“Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors:The Role Of Glycosylation,”Immunol.Lett.44:111-17;Lund,J.等人(1995)“Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors,”FASEB J.9:115-19;Alegre,M.L.等人(1994)“A Non-Activating″Humanized″Anti-CD3Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo,”Transplantation 57:1537-1543;Lund等人(1992)“Multiple Binding Sites On The CH2Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11,”Mol.Immunol.29:53-59;Lund等人(1991)“Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG,”J.Immunol.147:2657-2662;Duncan,A.R.等人(1988)“Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG,”Nature 332:563-564;美国专利第5,624,821;5,885,573;6,194,551;7,276,586和7,317,091号及PCT公布WO 00/42072和PCT WO 99/58572。

[0366] 本发明包括包含由以下在表1中列出的任何突变组成或包含那些突变的变体Fc区域的分子。

[0367]

表 1 示例性的 Fc 修饰							
单一位点的置换							
S132I	F241W	D265N	D280Q	Y296T	D312A	L328I	K334E
A162V	F241Y	D265Q	D280Y	N297D	W313F	L328K	K334H
S219Y	F241Y	D265T	G281D	N297E	N315I	L328M	K334I
K222N	F243D	D265V	G281K	N297I	E318K	L328N	K334L
H224L	F243H	D265Y	G281P	N297S	K320E	L328P	K334M
T225S	F243L	V266A	G281Y	S298A	K320M	L328Q	K334N
P228E	F243L	V266I	V282M	S298D	K320Q	L328R	K334Q
P228G	F243Q	V266M	E283A	S298N	K320R	L328S	K334V
P228K	F243R	V266T	V284E	S298N	K322E	L328T	T335K
P228Y	F243W	S267A	V284L	S298N	V323I	L328V	T335Q
P230A	F243Y	H268A	V284N	S298P	N325A	L328W	I336E
P230E	P244H	H268N	V284T	S298V	N325D	L328Y	I336K
P230G	P245A	D270E	V284Y	T299A	N325E	A330I	I336Y
P230Y	P247G	P271A	H285A	T299D	N325F	A330K	S337A
A231E	P247L	P271D	N286A	T299E	N325G	A330L	A339T
A231G	P247V	P271E	N286D	T299F	N325H	A330S	M352L
A231K	K248M	P271F	N286S	T299G	N325I	A330V	T359A
A231P	R255A	P271G	K288N	T299H	N325K	A330Y	T359N
A231Y	T256A	P271H	K290A	T299I	N325L	P331A	K360A
P232E	E258A	P271I	K290G	T299K	N325M	I332A	T366N
P232G	V262A	P271K	K290S	T299L	N325P	I332D	T366S
P232K	V262E	P271L	K290T	T299M	N325R	I332E	F372Y
P232Y	V262F	P271M	K290Y	T299N	N325S	I332F	F372Y
E233D	V262I	P271N	P291D	T299P	N325T	I332G	I377F
E233G	V262T	P271Q	P291E	T299Q	N325V	I332H	I377N
L234I	V263A	P271R	P291G	T299R	N325W	I332K	V379L
L235D	V263I	P271S	P291H	T299S	N325Y	I332L	V379M
S239D	V263M	P271T	P291I	T299V	K326A	I332M	K392R
S239E	V263T	P271V	P291Q	T299W	K326D	I332N	P396H

[0368]

表 1 示例性的 Fc 修饰							
S239N	V264A	P271W	P291T	T299Y	K326E	I332P	P396L
S239Q	V264E	P271Y	R292G	Y300I	K326E	I332Q	L398V
V240A	V264F	E272A	R292L	Y300L	K326N	I332R	S400P
V240I	V264I	E272Q	E294N	R301M	K326S	I332S	D401V
V240M	V264R	V273I	Q295K	R301M	K326T	I332T	S407I
V240T	V264T	F275L	Y296D	V302I	L328A	I332V	K414N
F241E	V264W	F275W	Y296E	S304D	L328D	I332W	E430A
V241I	D265F	F275Y	Y296H	S304H	L328E	I332Y	
F241L	D265H	N276A	Y296N	S304L	L328F	E333A	
F241R	D265I	D280A	Y296P	S304N	L328G	K334A	
F241S	D265L	D280H	Y296Q	S304T	L328H	K334E	
两个位点的置换							
I332E, A330L		S239N / I332Q		V279L, P395S		P396L, P217S	
I332E, L328D		S239Q / I332D		V284A, F372L		P396L, P227S	
I332E, L328E		S239Q / I332E		K288N, K326N		P396L, V323I	
I332E, L328H		S239Q / I332N		K288N, A330S		P396L, V240A	
I332E, L328I		S239Q / I332Q		K290E, L142P		P396L, L242F	
I332E, L328M		V240I, V281M		K290E, P227S		P396L, P244H	
I332E, L328N		F241L, E258G		K290T, G371D		P396L, T250A	
I332E, L328Q		F241L / V262I		P291S, P353Q		P396L, R255L	
I332E, L328T		F243L, E318K		R292P, V305I		P396L, E258D	
I332E, L328V		F243I, V379L		S298A / I332E		P396L, H268D	
I332E, N297D		P243L / V264I		S298N, W381R		P396L, H268N	
I332E, N297E		K246T, Y319F		S298N, S407R		P396L, V303I	
I332E, N297S		K246T, P396H		K317N, F423-DEL		P396L, K326I	
S166N, K409R		P247H, G285E		K326E, K320E		P396L, V305L	
P232S, S304G		P247L, I377F		K326E, A330T		P396L, L358P	
S239D / I332D		P247L, E389G		K326E, G385E		P396L, K370E	
S239D / I332E		P247S, P396L		A330V, Q419H		P396L, S375C	
S239D / I332N		P247L, L398Q		K334E, E233D		P396L, V379M	
S239D / I332Q		P247L, L406F		K334N, K246I		P396L, N384K	
S239E / D265N		P247L, N421K		K334E, K288M		P396L, K392T	
S239E / D265Q		L251F, F372L		K334E, R292L		P396L, S400F	
S239E / I332D		L251F, S415I		K334E, E308D		P396L, L410H	
S239E / I332E		R255L, E318K		K334E, E380D		P396L, Q419H	
S239E / I332N		R255Q, K326E		K334N, P396L		P396L, Q419L	
S239E / I332Q		E258D, N384K		A339V, Q347H		P396L, V427A	
S239N / I332D		V263Q, E272D		K370N, S440N		D399E, G402D	
S239N / I332E		V264I / I332E		T394M, V397M		D399E, M428L	
S239N / I332N		H268D, E318D		P396L, K210M			
三个位点的置换							

[0369]

表 1 示例性的 Fc 修饰		
V185M, R292L, D399E	P217S, A378V, S408R	K218R, G281D, G385R
S192T, M252L, R301C	P247L, I253N, K334N	P247L, A330T, S440G
V125L, V215I, S408I	D312E, K327N, I378S	T355N, P387S, H435Q
R292L, T359N, P396L	E216D, E345K, S375I	P247L, A431V, S442F
F275I, K334N, V348M	K288N, A330S, P396L	A378V, N390I, V422I
F243L, R255L, E318K	G316D, A378V, D399E	V282E, V369I, L406F
K334E, T359N, T366S	N315I, V379M, T394M	V397M, T411A, S415N
K288N, A330S, P396L	P247L,W313R,E388G	T223I, T256S, L406F
F243I, V379L, G420V	R301H, K340E,D399E	K246N, P396L, Q419R
A231V, Q386H, V412M	K326I, P396L, S408N	P217A, T359A, P396L
E216D,K334R,S375I	K210M, K261N, P396L	V215I, K290V, P396L
T335N, P387S, H435Q	A330V, G427M, K438R	V263Q, E272D, Q419H
K246I, Q362H, K370E	K222E, V263Q, S298N	N276Y, T393N, W417R
K334E, E380D, G446V	E233G, P247S, L306P	D270E, G316D, R416G
V303I, V369F, M428L	S219T, T225K, D270E	D270E, K392T, P396L
K246E, V284M, V308A	R292P, F243L, V305I	R255L, D270E, P396L
E293V, Q295E, A327T	V284M, R292L, K370N	V240A, D270E, P396L
Y319F, P352L ,P396L	D270E, K370E, P396L	270E, P396L, Q419HD
K290T, N390I, P396L	P247L, D270E, N421K	S239D, A330L, I332E
N297D, A330Y, I332E	Y296D, N297D, I332E	S239D, A330Y, I332E
N297D, T299L, I332E	Y296E, N297D, I332 E	S239D, I332E, A330I
N297D, T299I, I332E	Y296H, N297D, I332E	S239D, N297D, I332E
N297D, T299L, I332E	Y296N, N297D, I332E	S239D, S298A, I332E
N297D, T299V, I332E	Y296Q, N297I, I332E	S239D, V2641I, I332E
F243L, V262I, V264W	Y296T, N297D, I332E	S239E, N297D, I332E
D265F, N297E, I332E	P230A, E233D, I332E	S239E, V264I, I332 E
D265Y, N297D, I332E	P244H, P245A, P247V	S239N, A330L, I332E
V264E, N297D, I332E	V264I, A330Y, I332E	S239N, A330Y, I332E
V264I, A330L, I332E	V264I, S298A, I332E	S239Q, V264I, I332E
四个位点的置换		
A141V, H268L, K288E, P291S		T256S, V305I, K334E, N390S
E258D, T289A, H310Y, Y407V		D280E, S354F, A431D, L441I
K334E, T359N, T366S, Q386R		P343S, P353L, S375I, S383N
K326Q, K334E, T359N, T366S		E269K ,K290N, Q311R, H433Y
K288R, T307A, K344E, P396L		K290E, V369A, T393A, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L		K210N, K222I, K320M, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L		S219T, T225K, D270E, K360R
V282L, A330V, H433Y, T436R		P243L, S254T, A330V, N361D
R255L, D270E,Y300L, P396L,		F243L, D270E, K392N, P396L
R255L, D270E, R292G, P396L		F243L, R255L, D270E, P396L
V284M, S298N, K334E, R355W		S239D, D265F, N297D, I332E

[0370]

表 1 示例性的 Fc 修饰	
D265Y, N297D, T299L, I332E	S239D, D265H, N297D, I332E
F241E, F2430, V262T, V264F	S239D, D265I, N297D, I332E
F241E, F243R, V262E, V264R	S239D, 0265L, N297D, I332E
F241E, F243Y, V262T, V264R	S239D, D265T, N297D, I332E
F241L, F243L, V262I, V264I	S239D, D265V, N297D, I332E
F241R, F2430, V262T, V264R	S239D, D265Y, N297D, I332E
F241W, F243W, V262A, V264A	S239D, N297D, I332E, A330Y
F241Y, F243Y, V262T, V264T	S239D, N297D, I332E, K326E
N297D, I332E, S239D, A330L	S239D, N297D, I332E, L235D
N297D, S298A, A330Y, I 332E	S239D, V264I, A330L, I332E
S239D, A330Y, I332E, K326E	S239D, V264I, S298A, I332E
S239D, A330Y, I332E, K326T	S239E, V264I, A330Y, I332 E
S239D, A330Y, I332E, L234I	S239D, A330Y, I332E, V264T
S239D, A330Y, I332E, L235D	S239D, A330Y, I332E, V266I
S239D, A330Y, I332E, V240I	
五个位点的置换	
V284M, S298N, K334E, R355W, R416T	K147T, Y202M, F275I, K334N, V348M
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	T335N, K370E, A378V, T394M, S424L
F243L, V305I, A378D, P396L, F404S	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M
K222N, T335N, K370E, A378V, T394M	P244A, K326I, C367R, S375I, K447T
L235P, S304G, V305I, V323I, V382M	C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V
F241E, F2430, V262T, V264E, I332E	F241R, F243Q, V262T, V264R, I332E
F241E, F243R, V262E, V264R, I332E	S239E, V264I, S298A, A330Y, I332E
F241E, F243Y, V262T, V264R, I332E	
多于五个位点的置换	
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	
T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L	
F241Y, F243Y, V262T, V264T, N297D, I332E	
N297D, T299F, I332E, N297D, T299H, I332E	
D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L	
S239D, N297D, I332E, A330Y, F241S, F243H, V262T, V264T	
K133M, F149Y, K205E, R214I, K218E, S383N, N384K, T256N, V262L	

[0371] 在特定的实施方式中,这些抗B7-H3抗体的变体Fc区域具有:

[0372] (1)位置247处的亮氨酸、位置421处的赖氨酸和位置270处的谷氨酸;

[0373] (2)位置392处的苏氨酸、位置396处的亮氨酸、位置270处的谷氨酸和位置243处的亮氨酸;

[0374] (3)位置419处的组氨酸、位置396处的亮氨酸和位置270处的谷氨酸;

[0375] (4)位置419处的组氨酸、位置396处的亮氨酸、位置270处的谷氨酸和位置243处的亮氨酸;

[0376] (5)位置240处的丙氨酸、位置396处的亮氨酸和位置270处的谷氨酸;

[0377] (6)位置255处的赖氨酸和位置396处的亮氨酸；

[0378] (7)位置255处的赖氨酸、位置396处的亮氨酸和位置270处的谷氨酸；

[0379] (8)位置255处的赖氨酸、位置396处的亮氨酸、位置270处的谷氨酸和位置300处的赖氨酸；

[0380] (9)位置255处的赖氨酸、位置396处的亮氨酸、位置270处的谷氨酸和位置292处的甘氨酸；

[0381] (10)位置255处的赖氨酸、位置396处的亮氨酸、位置270处的谷氨酸和位置243处的亮氨酸；

[0382] (11)位置370处的谷氨酸、位置396处的亮氨酸和位置270处的谷氨酸；

[0383] (12)位置270处的谷氨酸、位置316处的天冬氨酸和位置416处的甘氨酸；

[0384] (13)位置243处的亮氨酸、位置292处的脯氨酸、位置305处的异亮氨酸和位置396处的亮氨酸；

[0385] (14)位置243处的亮氨酸、位置270处的谷氨酸、位置392处的天冬酰胺和位置396处的亮氨酸；

[0386] (15)位置243处的亮氨酸、位置255处的亮氨酸、位置270处的谷氨酸和位置396处的亮氨酸；

[0387] (16)位置297处的谷氨酰胺；

[0388] 或

[0389] (17)以上(1)-(16)的置换的任意组合。

[0390] 在某些实施方式中，本发明的分子还包含一个或多个糖基化位点，使得一个或多个碳水化合物部分与该分子共价连接。优选地，与亲本抗体相比在Fc区域具有一个或多个糖基化位点和/或一个或多个修饰的本发明的分子给予或具有增强的抗体介导的效应功能例如，增强的ADCC活性。在某些实施方式中，本发明还包括包含已知与抗体的碳水化合物部分直接或间接地相互作用的氨基酸的一个或多个修饰的分子，所述氨基酸包括但不限于位置241、243、244、245、245、249、256、258、260、262、264、265、296、299和301处的氨基酸。直接或间接地与抗体的碳水化合物部分相互作用的氨基酸是本领域已知的，参见，例如Jefferis等人，1995Immunology Letters，44:111-7，本文通过引用将其全部并入。

[0391] 在另一个实施方式中，本发明包括已通过将一个或多个糖基化位点引入到这些分子的一个或多个位点而被修饰的分子，优选地不改变分子的功能性，例如对靶抗原或FcγR的结合活性。糖基化位点可引入到本发明的分子的可变区和/或恒定区。如本文所用的，“糖基化位点”包括抗体中寡糖(即，包含两个或更多个连接在一起的单糖的碳水化合物)将特异性且共价地连接的任何特定的氨基酸序列。寡糖侧链通常通过N-或O-连接与抗体的骨架连接。N-连接的糖基化是指寡糖部分与天冬酰胺残基侧链的连接。O-连接的糖基化是指寡糖部分与羟基氨基酸例如丝氨酸、苏氨酸的连接。本发明的分子可包含一个或多个糖基化位点，包括N-连接和O-连接的糖基化位点。根据本发明可使用本领域已知的用于N-连接和O-连接的糖基化的任何糖基化位点。在根据本发明的方法中有用的示例性的N-连接的糖基化位点是氨基酸序列：Asn-X-Thr/Ser，其中X可以是任何氨基酸且Thr/Ser表示苏氨酸或丝氨酸。可使用本发明所属领域熟知的方法将这样的一个位点或多个位点引入到本发明的分子中(参见例如In vitro Mutagenesis，Recombinant DNA:A Short Course，J.D.Watson，等人

W.H.Freeman和Company,New York,1983,第8章,第106-116页,本文通过引用将其全部并入)。用于将糖基化位点引入到本发明的分子中的示例性方法可以包括:对分子的氨基酸序列进行修饰或突变以获得期望的Asn-X-Thr/Ser序列。

[0392] 在某些实施方式中,本发明包括通过添加或缺失糖基化位点来改变本发明的分子的碳水化合物含量的方法。用于改变抗体的碳水化合物含量的方法是本领域已知的并被包括在本发明中,参见例如美国专利第6,218,149号;EP 0 359 096B1;美国公布第US 2002/0028486号;WO 03/035835;美国公布第2003/0115614号;美国专利第6,218,149号;美国专利第6,472,511号;所有这些文献被通过引用全部并入本文。在其他实施方式中,本发明包括通过缺失分子的一个或多个内源碳水化合物部分来改变本发明的分子的碳水化合物含量的方法。在特定的实施方式中,本发明包括通过修饰邻近297的位置来转移抗体的Fc区域的糖基化位点。在特定的实施方式中,本发明包括修饰位置296使得位置296而非位置297被糖基化。

[0393] 效应功能还可通过例如将一个或多个半胱氨酸残基引入到Fc区域的技术来改变,从而允许发生该区域内链间二硫键的形成,导致可能具有提高的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和ADCC的同二聚体抗体的产生(Caron,P.C.等人(1992)"Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies,"J.Exp.Med.176:1191-1195;Shopes,B.(1992)"A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity,"J.Immunol.148(9):2918-2922)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如在Wolff,E.A.等人(1993)"Monoclonal Antibody Homodimers:Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice,"Cancer Research 53:2560-2565中描述的异双官能交联剂制备。可选择地,可构建具有双Fc区域且从而可具有增强的补体溶解和ADCC能力的抗体(Stevenson,G.T.等人(1989)"A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions(bisFabFc)Prepared By Manipulations At The IgG Hinge,"Anti-Cancer Drug Design 3:219-230)。

[0394] E.B7-H3DART™(双亲和再靶向试剂)

[0395] 如以上讨论的,本发明还包括"DART™"(双亲和再靶向试剂)分子,其包含形成至少两个表位结合位点的至少两个多肽链,所述表位结合位点的至少一个特异性结合B7-H3。

[0396] 在优选的实施方式中,DART™的第一多肽链包含:

[0397] (i)结构域(A),其包含表位(1)特异性的第一免疫球蛋白的轻链可变域(VL1)的结合区域;

[0398] (ii)结构域(B),其包含表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的重链可变域(VH2)的结合区域;和

[0399] (iii)结构域(C)。

[0400] 该DART™的第二多肽链包含:

[0401] (i)结构域(D),其包含表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的轻链可变域(VL2)的结合区域;

[0402] (ii)结构域(E),其包含表位(1)特异性的第一免疫球蛋白的重链可变域(VH1)的结合区域;和

[0403] (iii)结构域(F)。

[0404] DART™的结构域(A)和(B)不彼此结合形成表位结合位点。相似地,DART™的结构域(D)和(E)不彼此结合形成表位结合位点。更确切地,DART™的结构域(A)和(E)结合形成结合表位(1)的结合位点;所述DART™的结构域(B)和(D)结合形成结合所述表位(2)的结合位点。结构域(C)和(F)共价地结合在一起。

[0405] DART™分子的每条多肽链包含VL结构域和VH结构域,这两个结构域共价连接,使得这两个结构域受自身组装的限制。两条多肽链的相互作用将产生两种VL-VH配对,形成两个表位结合位点,即,二价分子。VH或VL结构域都不局限于多肽链内的任何位置,即,不局限于氨基(N)端或羧基(C)端,这些结构域也不彼此局限于其相对的位置,即,VL结构域可处于VH结构域的N端且反之亦然。唯一的限制在于要可得到互补多肽链,以形成有功能的DART™。如果VL和VH结构域衍生自同一抗体,两条互补多肽链可以是相同的。例如,如果结合结构域衍生自表位A特异性的抗体A(即,结合结构域由VL_A-VH_A相互作用形成),每条多肽将包含VH_A和VL_A。抗体的两条多肽链的同二聚化将导致形成两个VL_A-VH_A结合位点,产生二价的单特异性抗体。如果VL和VH结构域衍生自不同抗原特异性的抗体,则功能性的双特异DART™的形成需要两条不同多肽链的相互作用,即,形成异二聚体。例如,对于双特异性的DART™,一条多肽链将包含VL_A和VL_B;所述链的同二聚化将导致形成不具有结合或具有不可预测的结合的两个VL_A-VH_B结合位点。相比而言,当两条不同的多肽链在例如重组表达系统中自由地相互作用时,一条包含VL_A和VH_B且另一条包含VL_B和VH_A,两个不同的结合位点将形成:VL_A-VH_A和VL_B-VH_B。对于所有的DART™多肽链对,两条链可能的错配或错误结合是一种可能性,即,VL-VL或VH-VH结构域的相互作用;然而,基于适当二聚化的结合位点的免疫特异性使用本领域已知的或本文例示的基于亲和的任何方法例如,亲和层析,容易进行功能性双抗体的纯化。

[0406] DART™的多肽链中的一条或多条可任选地包含Fc结构域或其部分(例如,CH2结构域或CH3结构域)。Fc结构域或其部分可衍生自任何免疫球蛋白的同种型或同种异型,包括但不限于IgA、IgD、IgG、IgE和IgM。在优选的实施方式中,Fc结构域(或其部分)衍生自IgG。在特定的实施方式中,IgG同种型是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其同种异型。在一个实施方式中,双抗体分子包含Fc结构域,该Fc结构域包含独立地选自任何免疫球蛋白同种型的CH2结构域和CH3结构域(即,包含衍生自IgG的CH2结构域和衍生自IgE的CH3结构域或衍生自IgG1的CH2结构域和衍生自IgG2的CH3结构域等的Fc结构域)。Fc结构域可在相对于构成本发明的双抗体分子的多肽链的其他结构域或部分的任何位置被构建到该多肽链中(例如,Fc结构域或其部分可处于该多肽链的VL和VH结构域两者的c-端;可处于VL和VH结构域两者的n-端;或可处于一个结构域的N端和另一个的c-端(即,在多肽链的两个结构域之间))。

[0407] DART™分子的多肽链中的Fc结构域优先二聚化,导致形成表现出免疫球蛋白样性质,例如Fc-Fcγ R相互作用的DART™分子。包含Fc的双抗体可以是二聚体,例如由各自包含VH结构域、VL结构域和Fc结构域的两条多肽链构成。所述多肽链的二聚化产生包含Fc结构域的二价DART™,但是具有不同于未修饰的二价抗体的结构的结构。相对于野生型免疫球蛋白,这些DART™分子将显示出改变的表型,例如,改变的血清半衰期、结合特性等。在其他实施方式中,包含Fc结构域的DART™分子可以是四聚体。这些四聚体包含两条‘较重的’多肽链,即包含VL、VH和Fc结构域的多肽链,和两条‘较轻的’多肽链,即包含VL和VH的多肽链。较轻的链和较重的链相互作用形成单体,且所述单体经其未配对的Fc结构相互作用而形成Ig-样分子。该Ig-样DART™是四价的且可以是单特异性、双特异性或四特异性的。

[0408] 形成如上文所述的四特异性的双抗体分子需要四条不同多肽链的相互作用。由于具有潜在链错配的许多变体，这些相互作用难以在单细胞重组生产系统中有效地实现。增加错配概率的一种解决方案是将“钮入孔(knobs-into-holes)”型突变构建到期望的多肽链对中。比起同源二聚化，这些突变更偏爱异源二聚化。例如，关于Fc-Fc相互作用，可将氨基酸置换(优选地用包含形成‘钮’的大体积的侧基的氨基酸，例如色氨酸置换)引入到CH2或CH3结构域中，使得空间位阻将阻止与相似突变的结构域的相互作用并将迫使突变的结构域与其中已构建互补或容纳性突变，即“孔”(例如，用甘氨酸置换)的结构域配对。这些突变组可被构建到构成双抗体分子的任何成对的多肽中，且还可被构建到所述一对多肽链的任何部分中。特别是关于免疫球蛋白样分子的构建，偏爱异源二聚化胜过同源二聚化的蛋白质构建方法是本领域熟知的，并包括在本文内(参见例如Ridgway等人(1996)“’Knobs-Into-Holes’Engineering Of Antibody CH3Domains For Heavy Chain Heterodimerization,”Protein Engr.9:617-621,Atwell等人(1997)“Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,”J.Mol.Biol.270:26-35,和Xie等人(2005)“A New Format Of Bispecific Antibody:Highly Efficient Heterodimerization,Expression And Tumor Cell Lysis,”J.Immunol.Methods 296:95-101;在此通过引用将其每一个通过引用全部并入本文。

[0409] 本发明还包括包含变体Fc结构域或变体铰链-Fc结构域(或其部分)的双抗体分子，相对于相当的野生型Fc结构域或铰链-Fc结构域(或其部分)，该变体Fc结构域包含至少一个氨基酸修饰(例如，置换、插入、缺失)。相对于包含野生型Fc结构域或铰链-Fc结构域或其部分的分子，包含变体Fc结构域或铰链-Fc结构域(或其部分)的分子(例如，抗体)通常具有改变的表型。变体表型可被表示为如在NK依赖性或巨噬细胞依赖性的测定中测试的改变的血清半衰期、改变的稳定性、改变的对细胞的酶的敏感性或改变的效应功能。以上公开了被鉴定为改变的效应功能的Fc结构域修饰。

[0410] 本发明还包括包含铰链区的分子。铰链区可衍生自任何免疫球蛋白的同种型或同种异型，包括但不限于IgA、IgD、IgG、IgE和IgM。在优选的实施方式中，铰链区衍生自IgG，其中IgG同种型是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其同种异型。所述铰链区可与Fc结构域一起被构建到构成双抗体分子的一条多肽链中，使得双抗体分子包含铰链-Fc结构域。在某些实施方式中，铰链区和Fc结构域独立地选自本领域已知或本文例示的任何免疫球蛋白的同种型。在其他实施方式中，铰链区和Fc结构域被多肽链的至少一个其他结构域例如VL结构域隔开。铰链区或任选地铰链-Fc结构域可在相对于本发明的多肽链的其他结构域或部分的任何位置被构建到所述多肽链中。在某些实施方式中，本发明的多肽链包含铰链区，该铰链区位于多肽链的C端，其中所述多肽链不包含Fc结构域。又在其他实施方式中，本发明的多肽链包含铰链-Fc结构域，该铰链-Fc结构域位于多肽链的C端。在另外的实施方式中，本发明的多肽链包含铰链-Fc结构域，该铰链-Fc结构域位于多肽链的N端。

[0411] DART™的多肽链的每个结构域，即VL、VH和Fc结构域可被肽接头隔开。肽接头的长度可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8或9个氨基酸。在某些实施方式中，氨基酸接头序列是由核苷酸序列ggaggcggat ccggaggcgg aggc(SEQ ID NO:53)编码的GGGSGGGG(SEQ ID NO:52)。DART™分子的多肽链可被构建成包含将与DART™的第二多肽链上的对应半胱氨酸残基相互

作用以形成链间二硫键的至少一个半胱氨酸。该链间二硫键用来稳定DART™分子，从而提高在重组系统中的表达和回收，产生稳定且一致的制剂并提高分离和/或纯化的产物的体内稳定性。半胱氨酸残基可作为单一的氨基酸或作为较大的氨基酸序列例如，铰链区的一部分引入到多肽链的任何部分中。在特定的实施方式中，半胱氨酸残基可被构建成在多肽链的C端出现。在某些实施方式中，半胱氨酸残基在氨基酸序列LGGC内被引入到多肽链中。在特定的实施方式中，构成本发明的DART™分子的多肽链的C端包含氨基酸序列LGGC(SEQ ID NO:54)。在另一个实施方式中，半胱氨酸残基在构成铰链区的氨基酸序列例如EPKSCDKTHTCPP(SEQ ID NO:55)或ESKYGPPCPS(SEQ ID NO:56)内被引入到多肽中。在特定的实施方式中，本发明的DART™分子的多肽链的C端包含IgG铰链区的氨基酸序列，例如SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56。在另一个实施方式中，本发明的DART™分子的多肽链的C端包含可由核苷酸序列gttgagccca aatcttgt(SEQ ID NO:58)编码的氨基酸序列VEPKSC(SEQ ID NO:57)。在其他实施方式中，半胱氨酸残基在可由核苷酸序列ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt(SEQ ID NO:60)编码的氨基酸序列LGGCFNRGEC(SEQ ID NO:59)内被引入到多肽链中。在特定的实施方式中，构成本发明的DART™分子的多肽链的C端包含氨基酸序列LGGCFNRGEC(SEQ ID NO:59)。又在其他实施方式中，半胱氨酸残基在可由核苷酸序列ttcaacaggg gagagtgt(SEQ ID NO:62)编码的氨基酸序列FNRGEC(SEQ ID NO:61)内被引入到多肽链中。在特定的实施方式中，构成本发明的DART™分子的多肽链的C端包含氨基酸序列FNRGEC(SEQ ID NO:61)。

[0412] 在某些实施方式中，双抗体分子包含至少两条多肽链，其每一条包含氨基酸序列LGGC(SEQ ID NO:54)并通过LGGC(SEQ ID NO:54)序列中的半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。在另一个特定的实施方式中，双抗体分子包含至少两条多肽链，其一条包含序列FNRGEC(SEQ ID NO:61)，而另一条包含铰链区(包含至少一个半胱氨酸残基)，其中所述至少两条多肽链通过FNRGEC(SEQ ID NO:61)中的半胱氨酸残基和铰链区中的半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。在特定的方面，促成二硫键的位于铰链区的半胱氨酸残基是Cys-128(根据Kabat EU编码；位于未修饰的完整的IgG重链的铰链区)且SEQ ID NO:23中的对应半胱氨酸残基是Cys-214(根据Kabat EU编码；位于未修饰的完整的IgG轻链的C端)(Elkabetz等人(2005)“Cysteines In CH1Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains,”J.Biol.Chem.280:14402-14412)。又在其他实施方式中，该至少一个半胱氨酸残基被构建成在氨基酸链的N端出现。又在其他实施方式中，该至少一个半胱氨酸残基被构建成在双抗体分子的多肽链的接头部分出现。在另外的实施方式中，VH或VL结构域被构建成相对于亲本VH或VL结构域包含至少一个氨基酸修饰，使得所述氨基酸修饰包含以半胱氨酸置换亲本氨基酸。

[0413] 又在本发明的另一方面，第一多肽链的结构域(C)包含衍生自人IgG的铰链区且可由核苷酸序列gttgagccca aatcttgt(SEQ ID NO:58)编码的氨基酸序列VEPKSC(SEQ ID NO:57)。在该实施方式的另一方面，第二多肽链的结构域(F)包含氨基酸序列VEPKSC(SEQ ID NO:57)。在该实施方式的某些方面，第一多肽链的结构域(C)包含人κ轻链的C端6个氨基酸，FNRGEC(SEQ ID NO:61)；且第二多肽链的结构域(F)包含氨基酸序列VEPKSC(SEQ ID NO:57)或铰链区。在该实施方式的其他方面，第二多肽链的结构域(F)包含人κ轻链的C端6个氨基酸FNRGEC(SEQ ID NO:61)；且第一多肽链的结构域(C)包含氨基酸序列VEPKSC(SEQ

ID NO:57)或铰链区。

[0414] 如根据前述内容将理解的,双特异性DART™的单独多肽可形成两类同二聚体和一类异二聚体。在本发明的一个实施方式中,带电荷的多肽可添加到DART™的一条或更优选地两条多肽的C端。通过选择对于双特异性DART™的单独多肽具有相反电荷的带电荷的多肽,这种带电荷的多肽的加入有利于异二聚体的形成并减少同二聚体的形成。优选地,带正电荷的多肽将包含大量精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和/或赖氨酸(或这些氨基酸的混合物)且带负电荷的多肽将包含大量天冬氨酸或谷氨酸(或这些氨基酸的混合物)。包含大量赖氨酸的带正电荷的多肽和包含大量谷氨酸的带负电荷的多肽是特别优选的。为了使这些带相反电荷的多肽之间的静电吸引最大化,优选采用能够自发地采取螺旋构象的多肽。

[0415] 因此,在优选的实施方式中,带正电荷的"E卷曲"将附接到待用来形成双特异性DART™的多肽中的一条上,且带负电荷的"K卷曲"将附接到DART™的多肽中的第二条上。特别优选的E卷曲将具有序列:(EVAALEK)$_4$[即(SEQ ID NO:63):EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]。特别优选的K卷曲将具有序列:(KVAALKE)$_4$[即(SEQ ID NO:64):KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE]。

[0416] 具有该E卷曲的优选的DART™多肽将具有通用序列:[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(EVAALEK)$_4$]—GGGNS,其中VL是DART™的可变的轻的Ig结构域,GGGSGGGG是SEQ ID NO:52,VH是DART™的可变的重的Ig结构域,(EVAALEK)$_4$是SEQ ID NO:63且GGGNS是SEQ ID NO:65。具有该K卷曲的优选的DART™多肽将具有通用序列:[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(KVAALKE)$_4$]—GGGNS,其中VL是DART™的可变的轻的Ig结构域,GGGSGGGG是SEQ ID NO:52,VH是DART™的可变的重的Ig结构域,(KVAALKE)$_4$是SEQ ID NO:64且GGGNS是SEQ ID NO:65。

[0417] 在另一个实施方式中,Fc-区域可被连接到E卷曲或K卷曲DART™的E和/或K卷曲。在其中间隔较小地布置这些结构域导致这些结构域和其结合配体之间的相互作用减弱,或以其他方式干扰DART™组装的情况下,加大包含Fc的DART™的Fc区域和DART™ VH结构域之间的间隔是期望的。虽然可采用任何氨基酸序列的间隔区,但是优选采用形成α螺旋卷曲的间隔区,以最大程度地使Fc结构域远离可变域延伸并伸出。因为具有相反电荷的上述卷曲的多肽还起促进异二聚体形成的作用,这些分子是特别优选的间隔区。这种包含卷曲的Fc-DART™分子提供了与Fc-DART™的益处相似的益处,包括提高的血清半衰期和效应功能补充。对于该目的,上述E卷曲和K卷曲的多肽是特别优选的。因此,在优选的实施方式中,E卷曲的包含Fc的DART™将具有通用序列:始于D234(Kabat编号)的[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(EVAALEK)$_4$]—GGG—Fc结构域,其中VL是DART™的可变的轻的Ig结构域,GGGSGGGG是SEQ ID NO:52,VH是DART™的可变的重的Ig结构域,(EVAALEK)$_4$是SEQ ID NO:63。相似地,在优选的实施方式中,K卷曲的包含Fc的DART™将具有通用序列:始于D234(Kabat编号)的[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(KVAALKE)$_4$]—GGG—Fc结构域,其中VL是DART™的可变的轻的Ig结构域,GGGSGGGG是SEQ ID NO:51,VH是DART™的可变的重的Ig结构域,(KVAALKE)$_4$是SEQ ID NO:64。

[0418] 如以上所指出的,包含卷曲的DART™分子或包含卷曲、包含Fc的DART™分子可仅包含单一的该卷曲间隔区或其可包含多于一个的该间隔区(例如,优选地具有相反电荷的两个间隔区,其中一个与DART™多肽的每一个VH结构域连接)。通过将Fc区域连接到该间隔区

分子，增强了通过链交换制备二价、四价等形式的Fc-DART™分子的能力。因此，取决于Fc结构域与DART™的VH结构域中的一个连接还是两个都连接，可产生形成单体或二聚体的Fc-DART™分子。

[0419] 1.B7-H3DART™分子的多功能性

[0420] 本发明的双特异性DART™可同时结合两个隔开且不同的表位。在某些实施方式中，这些表位来自同一抗原。在其他实施方式中，这些表位来自不同的抗原。在优选的实施方式中，至少一个表位结合位点是特异性针对免疫效应细胞上表达的决定簇(例如，CD3、CD16、CD32、CD64、T细胞受体等)，其表达在T淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞或其他单核细胞上。在一个实施方式中，DART™分子结合效应细胞决定簇且还活化所述效应细胞。就这一点而言，本发明的DART™分子可表现出独立于其是否还包含Fc结构域的Ig-样功能性(例如，如在本领域已知或本文例示的任何效应功能测定(例如，ADCC测定)中测定的)。在某些实施方式中，本发明的双特异性DART™结合肿瘤细胞上的癌抗原和效应细胞决定簇，同时活化所述细胞。在替代实施方式中，本发明的双特异性DART™或DART™分子可通过同时结合且因而连接上文所述的同一细胞上的活化型和抑制型受体(例如，结合CD32A和CD32B、BCR和CD32B或IgERI和CD32B)来抑制靶，例如效应细胞的活化(参见，背景部分)。在该实施方式的另一方面，双特异性DART™可通过同时结合病毒上的两个中和表位(例如，RSV表位；WNV表位例如E16和E53)表现出抗病毒特性。

[0421] 2.通用的B7-H3DART™分子

[0422] 在一个实施方式中，本发明的双特异性DART™分子可被构建成包含特异性结合B7-H3的一个表位结合结构域和特异性结合半抗原例如异硫氰酸荧光素(也称为荧光异硫氰酸酯或FITC)的第二表位结合结构域。该DART™用作通用衔接子(“UDART™”)，能够将B7-H3和与荧光素-连接的结合配体相互作用的分子共连接。例如，DART™的FITC-反应臂可用来结合与参与细胞间聚集、细胞间募集、无细胞募集的非B7-H3靶、多个靶等结合的FITC标记的抗体。嵌合的小鼠Fv/人Fc形式的抗荧光素MAb，4420可用作FITC-特异性CDR结构域的来源(Gruber,M.等人(1994)“Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli,”J.Immunol.152(11):5368-5374)。

[0423] 3.细胞-靶特异性的B7-H3DART™分子

[0424] 本发明的双特异性DART™分子提供独特的靶向特定细胞类型的机会。例如，本发明的双特异性DART™或DART™分子可被构建成包含识别靶细胞或组织类型特有的一组抗原的表位结合位点的组合。另外，如果在其他组织和/或细胞类型中单独抗原的任何一种或两种分别是非常普遍的，则低亲和力结合结构域可用来构建DART™或DART™分子。这些低亲和力结合结构域将不能够以足以用于治疗性目的的亲合力结合单独的表位或抗原。然而，如果这两种表位或抗原都存在于单一的靶细胞或组织上，则DART™或DART™分子对该细胞或组织的亲合力将相对于仅表达一种抗原的细胞或组织被增加，使得所述细胞或组织可通过本发明有效地靶向。相对于单特异性DART™或仅具有一种抗原特异性的抗体，该双特异性分子可对其在表达两种所述抗原的细胞上的靶抗原中的一种或两种显示出增强的结合。

[0425] 例如，本发明的B7-H3特异性DART™可被构建成包含为自然杀伤2D组(NKG2D)受体的结合配体的结构域。NKG2D受体表达在所有的人(和其他哺乳动物)的自然杀伤细胞上

(Bauer,S.等人(1999)“Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D,A Receptor For Stress-Inducible MICA,”Science 285(5428):727-729;Jamieson,A.M.等人(2002)“The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing,”Immunity 17(1):19-29)以及所有的$CD8^+$T细胞上(Groh,V.等人(2001)“Costimulation Of CD8αβT Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells,”Nat.Immunol.2(3):255-260;Jamieson,A.M.等人(2002)“The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing,”Immunity 17(1):19-29)。这些结合配体且特别是正常细胞上不表达的结合配体包括组织相容性60(H60)分子,视黄酸早期诱导基因-1(RAE-1)的产物,和小鼠UL16-结合蛋白样转录物1(MULT1)(Raulet D.H.(2003)“Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands,”Nature Rev.Immunol.3:781-790;Coudert,J.D.等人(2005)“Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells,”Blood106:1711-1717)。与人NKG2D反应性的另外的配体包括多态MHC I类链-有关的分子MICA和MICB(Diefenbach,A.等人(1999)“Natural Killer Cells:Stress Out,Turn On,Tune In,”Curr.Biol.9(22):R851-R8533;Bauer,S.等人(1999)“Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D,A Receptor For Stress-Inducible MICA,”Science 285(5428):727-729;Stephens,H.A.(2001)“MICA And MICB Genes:Can The Enigma Of Their Polymorphism Be Resolved?”Trends Immunol.22:378-385)。MICA的序列是SEQ ID NO:66:

[0426]

MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH
LDGQPFLRCD RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL
AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW
TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV
LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT
QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
LVLQSHWQTF HVSAVAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAEG PELVSLQVLD
QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

[0427] MICB的序列是SEQ ID NO:67:

[0428]

PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE
DVLGAKTWDT ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED
SSTRGSRHFY YDGELFLSQN LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM
KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV SEGNITVTCR ASSFYPRNIT
LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNGTYQT WVATRIRQGE EQRFTCYMEH
SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKTS
AAEGP

[0429] 可选择地,本发明的DART™分子可被构建成包含为T细胞受体(“TCR”)或CD3(T细胞共受体)受体的结合配体的结构域。TCR由CD4+或CD8+T-细胞天然表达并允许这些细胞识别

被抗原递呈细胞的I类或II类MHC蛋白质结合并递呈的抗原肽。TCR对pMHC(肽-MHC)复合物的识别引发细胞免疫反应的蔓延,导致细胞因子的产生和抗原递呈细胞的裂解(参见,例如Armstrong,K.M.等人(2008)“Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes,”Biochem.J.415(第2部分):183-196;Willemsen,R.(2008)“Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy,”Cytometry A.73(11):1093-1099;Beier,K.C.等人(2007)“Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation,”Eur.Respir.J.29:804-812;Mallone,R.等人(2005)“Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes,”Am.J.Ther.12(6):534-550)。CD3是结合TCR的受体(Thomas,S.等人(2010)“Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer,”Immunology 129(2):170-177;Guy,C.S.等人(2009)“Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3Complex,”Immunol.Rev.232(1):7-21;St.Clair,E.W.(2009年10月12日电子出版)“Novel Targeted Therapies For Autoimmunity,”Curr.Opin.Immunol.21(6):648-657;Baeuerle,P.A.等人(Epub 2009Jun 9)“Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,”Cancer Res.69(12):4941-4944;Smith-Garvin,J.E.等人(2009)“T Cell Activation,”Annu.Rev.Immunol.27:591-619;Renders,L.等人(2003)“Engineered CD3Antibodies For Immunosuppression,”Clin.Exp.Immunol.133(3):307-309)。

[0430] 通过将这些DART™分子构建成还包括能够结合例如,靶细胞表面上存在的受体的至少一个表位结合结构域,这些DART™分子将成为DART™分子且因此能够结合靶细胞且从而使靶细胞展示自然杀伤2D组(NKG2D)受体或TCR(无论哪一种存在于靶细胞-结合的DART™上)的结合配体(参见,例如Germain,C.等人(2008)“Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein,”Prot.Engineer.Design Selection 21(11):665-672)。这些DART™可用于将任何期望的靶细胞重新定向成是NK细胞介导的细胞裂解或T细胞介导的细胞毒作用的靶的细胞。在一个实施方式中,DART™的能够结合靶细胞表面上存在的受体的表位结合结构域是结合肿瘤相关抗原的表位,以将这些癌细胞重新定向成NK细胞介导的细胞裂解或T细胞介导的细胞毒作用的底物。特别感兴趣的是肿瘤相关抗原,该肿瘤相关抗原是乳腺癌抗原、卵巢癌抗原、前列腺癌抗原、宫颈癌抗原、胰腺癌抗原、肺癌抗原、膀胱癌抗原、结肠癌抗原、睾丸癌抗原、成胶质细胞瘤癌抗原、与B细胞恶性肿瘤有关的抗原、与多发性骨髓瘤相关的抗原、与非霍奇金淋巴瘤有关的抗原或与慢性淋巴细胞系白血病有关的抗原。

[0431] 用于该用途的合适的肿瘤相关抗原包括A33(一种结肠直肠癌抗原;Almqvist,Y.2006,Nucl Med Biol.Nov;33(8):991-998);B1(Egloff,A.M.等人2006,Cancer Res.66(1):6-9);BAGE(Bodey,B.2002Expert Opin Biol Ther.2(6):577-84);β-连环蛋白(Prange W.等人2003J Pathol.201(2):250-9);CA125(Bast,R.C.Jr.等人2005Int J Gynecol Cancer 15增刊3:274-81);CD5(Calin,G.A.等人2006Semin Oncol.33(2):167-73);CD19(Troussard,等人1998Hematol Cell Ther.40(4):139-48);CD20(Thomas,D.A.等人2006Hematol Oncol Clin North Am.20(5):1125-36);CD22(Kreitman,R.J.2006AAPS

J.18;8(3):E532-51);CD23(Rosati,S.等人2005Curr Top Microbiol Immunol.5;294:91-107);CD25(Troussard,X.等人1998Hematol Cell Ther.40(4):139-48);CD27(Bataille,R.2006Haematologica 91(9):1234-40);CD28(Bataille,R.2006Haematologica 91(9):1234-40);CD36(Ge,Y.2005Lab Hematol.11(1):31-7);CD40/CD154(Messmer,D.等人2005Ann N Y Acad Sci.1062:51-60);CD45(Jurcic,J.G.2005Curr Oncol Rep.7(5):339-46);CD56(Bataille,R.2006Haematologica 91(9):1234-40);CD79a/CD79b(Troussard,X.等人1998Hematol Cell Ther.40(4):139-48;Chu,P.G.等人2001Appl Immunohistochem Mol Morphol.9(2):97-106);CD103(Troussard,X.等人1998Hematol Cell Ther.40(4):139-48);CDK4(Lee,Y.M.等人2006Cell Cycle 5(18):2110-4);CEA(癌胚抗原;Mathelin,C.2006Gynecol Obstet Fertil.34(7-8):638-46;Tellez-Avila,F.I.等人2005Rev Invest Clin.57(6):814-9);CTLA4(Peggs,K.S.等人2006Curr Opin Immunol.18(2):206-13);EGF-R(表皮生长因子受体;Adenis,A.等人2003Bull Cancer.90Spec No:S228-32);Erb(ErbB1;ErbB3;ErbB4;Zhou,H.等人2002Oncogene 21(57):8732-40;Rimon,E.等人2004Int J Oncol.24(5):1325-38);GAGE(GAGE-1;GAGE-2;Akcakanat,A.等人2006Int J Cancer.118(1):123-8);GD2/GD3/GM2(Livingston,P.O.等人2005Cancer Immunol Immunother.54(10):1018-25);gp100(Lotem,M.等人2006J Immunother.29(6):616-27);HER-2/neu(Kumar,Pal S等人2006Semin Oncol.33(4):386-91);人乳头瘤病毒-E6/人乳头瘤病毒-E7(DiMaio,D.等人2006Adv Virus Res.66:125-59);KSA(17-1A)(Ragupathi,G.2005Cancer Treat Res.123:157-80);MAGE(MAGE-1;MAGE-3;(Bodey,B.2002Expert Opin Biol Ther.2(6):577-84);MART(Kounalakis,N.等人2005Curr Oncol Rep.7(5):377-82);MUC-1(Mathelin,C.2006Gynecol Obstet Fertil.34(7-8):638-46);MUM-1(Castelli,C.等人2000J Cell Physiol.182(3):323-31);N-乙酰葡糖胺转移酶(Dennis,J.W.1999Biochim Biophys Acta.6;1473(1):21-34);p15(Gil,J.等人2006Nat Rev Mol Cell Biol.7(9):667-77);PSA(前列腺特异性抗原;Cracco,C.M.等人2005Minerva Urol Nefrol.57(4):301-11);PSMA(Ragupathi,G.2005Cancer Treat Res.123:157-80);sTn(Holmberg,L.A.2001Expert Opin Biol Ther.1(5):881-91);TNF-受体(TNF-α受体、TNF-β受体或TNF-γ受体;van Horssen,R.等人2006Oncologist.11(4):397-408;Gardnerova,M.等人2000Curr Drug Targets.1(4):327-64);或VEGF受体(O'Dwyer.P.J.2006Oncologist.11(9):992-8)。

[0432] 用于该用途的另外的肿瘤相关抗原(及公开了针对这些抗原特异性地反应的抗体的出版物)包括ADAM-9(美国专利公布第2006/0172350号;PCT公布第WO 06/084075号);ALCAM(PCT公布第WO 03/093443号);羧肽酶M(美国专利公布第2006/0166291号);CD46(美国专利第7,148,038号;PCT公布第WO 03/032814号);细胞角蛋白8(PCT公布第WO 03/024191号);肝配蛋白受体(且特别是EphA2(美国专利第7,569,672号;PCT公布第WO 06/084226号);整联蛋白α-V-β-6(PCT公布第WO 03/087340号);JAM-3(PCT公布第WO 06/084078号);KID3(PCT公布第WO 05/028498号);KID31(PCT公布第WO 06/076584号);LUCA-2(美国专利公布第2006/0172349号;PCT公布第WO 06/083852号);制癌蛋白M(制癌蛋白受体β)(美国专利第7,572,896号;PCT公布第WO 06/084092号);PIPA(美国专利第7,405,061号;PCT公布第WO 04/043239号);ROR1(美国专利第5,843,749号);和转铁蛋白受体(美国专利

第7,572,895号;PCT公布第WO 05/121179号)。

[0433] 还感兴趣的是以下特定致病原所特有的抗原:例如病毒致病原,包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、流感、人乳头瘤病毒(HPV)、口蹄疫(柯萨奇病毒)、狂犬病毒、单纯疱疹病毒(HSV)和肠胃炎的致病原,包括轮状病毒、腺病毒、杯状病毒、星状病毒和诺沃克病毒;细菌致病原,包括但不限于大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella thyphimurium)、绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)、淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrhoeae)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、流感嗜血杆菌(Hemophilus influenzae)、痢疾志贺菌(Shigella dysenteriae)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)和肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae),真菌致病原和寄生虫,例如Giardi。

[0434] 在某些实施方式中,本发明的分子被构建成相对于模板分子的相当部分包含改变的糖基化模式或改变的糖型。所构建的糖型可用于多种目的,包括但不限于增强效应功能。所构建的糖型可通过本领域技术人员已知的任何方法产生,例如,通过使用所构建的或变体表达菌株,通过与一种或多种酶例如DI N-乙酰葡糖胺转移酶III(GnTI11)共表达,通过在多种生物体或来自多种生物体的细胞系中表达本发明的DART™,或通过在已表达和纯化DART™之后修饰碳水化合物。用于产生构建糖型的方法是本领域已知的,且包括但不限于在Umana等人(1999)“Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity,”Nat.Biotechnol 17:176-180;Davies等人(2001)“Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20CHO Production Cell Line:Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII,”Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields等人(2002)“Lack Of Fucose On Human IgG1N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity,”J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa等人(2003)“The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity,”J Biol Chem 278:3466-3473)US 6,602,684;USSN 10/277,370;USSN 10/113,929;PCT WO 00/61739A1;PCT WO 01/292246A1;PCT WO 02/311140A1;PCT WO 02/30954A1;Potillegent™技术(Biowa,Inc.Princeton,NJ);GlycoMAb™糖基化工程技术(GLYCART biotechnology AG,Zurich,Switzerland)中描述的方法;这些文献中的每一个被通过引用全部并入本文。参见,例如WO 00061739;EA01229125;US 20030115614;Okazaki等人(2004)“Fucose Depletion From Human IgG1Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgG1And FcGammaRIIIA,”JMB,336:1239-49,这些文献中的每一个被通过引用全部并入本文。

[0435] 本发明还包括并入非天然氨基酸以产生本发明的DART™。这些方法是本领域技术人员已知的,例如使用天然的生物合成机制以允许将非天然氨基酸并入到蛋白质中的方法,参见,例如Wang等人(2002)“Expanding The Genetic Code,”Chem.Comm.1:1-11;Wang

等人(2001)“Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli,”Science,292:498-500;van Hest等人(2001)“Protein-Based Materials,Toward A New Level Of Structural Control,"Chem.Comm.19:1897-1904,分别通过引用将其全部并入本文。替代策略集中于负责生物合成氨酰-tRNA的酶,参见,例如Tang等人(2001)“Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host,”J.Am.Chem.Soc.123(44):11089-11090;Kiick等人(2001)“Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli,”FEBS Lett.502(1-2):25-30;其每一个被通过引用全部并入本文。在某些实施方式中,本发明包括通过添加或缺失糖基化位点修饰本发明的分子的VL、VH或Fc结构域的方法。用于修饰蛋白质的碳水化合物的方法是本领域已知的并被包括在本发明中,参见例如美国专利第6,218,149号;EP 0 359096B1;美国公布第US 2002/0028486号;WO 03/035835;美国公布第2003/0115614号;美国专利第6,218,149号;美国专利第6,472,511号;所有这些文献被通过引用全部并入本文。

[0436] VIII.使用B7-H3调节剂和抗B7-H3抗体用于治疗目的的方法

[0437] B7-H3的单克隆抗体可在患癌症或其他疾病的个体中用于治疗目的。如上所述,用抗B7-H3抗体治疗可包括在体外和体内形成复合物。在一个实施方式中,单克隆抗体抗B7-H3可结合癌性细胞并减少其增殖。应理解抗体以促进在生理(例如,体内)条件下的结合的浓度施用。在另一个实施方式中,B7-H3的单克隆抗体可用于定位在不同组织例如结肠、肺、乳房、前列腺、卵巢、胰、肾和其他类型的癌症例如肉瘤的癌性细胞的免疫治疗。在另一个实施方式中,单克隆抗体抗B7-H3可结合癌细胞并减少其分裂。在另一个实施方式中,单克隆抗体抗B7-H3可结合癌性细胞并延迟转移的形成。又在另一个实施方式中,患癌症的个体被给予通过抗B7-H3抗体的姑息治疗。对癌症个体的姑息治疗包括治疗或减轻疾病的不利症状或由给予该疾病的其他治疗引起而不直接影响癌症进展的医源性症状。这包括用于疼痛减轻、营养支持、性问题、心理困扰、抑郁、疲劳、精神疾病、恶心、呕吐等的治疗。

[0438] 在这些情况下,抗B7-H3抗体可与增强或指导个体自身免疫反应的剂例如强化ADCC的剂一起施用。

[0439] 又在在另一个实施方式中,抗B7-H3抗体与放射性分子、毒素(例如,卡奇霉素)、化疗分子、包含化疗化合物的脂质体或其他囊泡偶联或结合并被施用到需要该治疗的个体以将这些化合物靶向到包含被该抗体识别的抗原的癌细胞并因此去除癌性或病态的细胞。不局限于任何具体的理论,抗B7-H3抗体被表面上携带B7-H3的细胞内化,从而将已偶联的部分递送到细胞以引发治疗作用。又在另一个实施方式中,该抗体可在手术去除表达抗原的癌症的时候用作辅助疗法以延迟转移的形成。该抗体还可在手术之前施用(新辅助疗法)到表达抗原的肿瘤的个体内以减小肿瘤的尺寸并因此实现或简化手术,在手术期间节约组织,和/或减少所致的缺损。

[0440] 本发明的实践中设想了细胞周期给药。在这些实施方式中,化疗剂用来使肿瘤或其他靶向病态细胞的细胞周期在预定的阶段同步。随后,进行本发明的抗B7-H3抗体的施用(单独地或与另外的治疗性部分一起)。在替代实施方式中,抗B7-H3抗体用来在施用第二轮治疗之前使细胞周期同步并减少细胞分裂;第二轮可以是抗B7-H3抗体和/或另外的治疗性部分的施用。

[0441] 化疗剂包括放射性分子、毒素(也称为细胞毒素或细胞毒性剂,其包括对癌性细胞的存活有害的任何剂)、药剂和包含化疗化合物的脂质体和其他囊泡。合适的化疗剂的实例包括但不限于1-去氢睾酮、5-氟脲嘧啶达卡巴嗪、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、放线菌素D、阿霉素、阿地白介素、烷化剂、别嘌呤醇钠、六甲蜜胺、氨磷汀、阿那曲唑、氨茴霉素(AMC)、抗有丝分裂剂、顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂、二氨基二氯铂、蒽环类、抗生素、抗代谢物、天冬酰胺酶、活的BCG(膀胱内)、倍他米松磷酸钠和醋酸倍他米松、比卡鲁胺、硫酸博莱霉素、白消安、亚叶酸钙、卡奇霉素、卡培他滨、卡铂、洛莫司汀(CCNU)、卡莫司汀(BSNU)、瘤可宁、顺铂、克拉屈滨、秋水仙素、共轭雌激素、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、环磷酰胺、阿糖孢苷、阿糖孢苷、细胞松弛素B、环磷酰胺(Cytoxan)、达卡巴嗪、更生霉素、更生霉素(以前的放线菌素)、盐酸柔红霉素、柠檬酸柔红霉素、地尼白介素、右丙亚胺、二溴甘露醇、二羟基蒽醌、多西他赛、甲磺酸多拉司琼、盐酸阿霉素、屈大麻酚、大肠杆菌L-天冬氨酸酶、吐根碱、重组人红细胞生成素α、欧文氏菌(Erwinia)L-天冬氨酸酶、酯化雌激素、雌二醇、雌莫司汀磷酸钠、溴化乙锭、乙炔雌二醇、羟乙磷酸盐、依托泊苷甲酰四氢叶酸、磷酸依托泊苷、非格司亭、氟脲苷、氟康唑、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他胺、亚叶酸、盐酸吉西他滨、糖皮质激素、醋酸戈舍瑞林、短杆菌肽D、盐酸格拉司琼、羟基脲、盐酸伊达比星、异环磷酰胺、干扰素α-2b、盐酸伊立替康、来曲唑、亚叶酸钙、醋酸亮丙立德(leuprolide acetate)、盐酸左旋咪唑、利多卡因、洛莫司汀、美登木素生物碱、盐酸氮芥、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸苯丙氨酸氮芥、巯基嘌呤、巯乙磺酸钠、甲氨蝶呤、甲睾酮、光神霉素、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、醋酸奥曲肽、盐酸恩丹西酮、紫杉醇、帕米膦酸二钠、喷司他丁、盐酸匹罗卡品、吡利霉素(plimycin)、聚苯丙生20(具有卡莫司汀植入物)、卟吩姆钠、普鲁卡因、盐酸丙卡巴肼、普萘洛尔、利妥昔单抗、沙格司亭、链脲佐菌素、他莫昔芬、紫杉醇、替尼泊甙、鬼臼噻吩甙、睾内酯、丁卡因、塞替派苯丁酸氮芥、硫鸟嘌呤、塞替派、盐酸拓扑替康、柠檬酸托瑞米芬、曲妥珠单抗、维甲酸、戊柔比星、硫酸长春碱、硫酸长春新碱和酒石酸长春瑞滨。

[0442] 在优选的实施方式中,细胞毒素在分裂或快速分裂的细胞中是尤其有效的,使得非分裂细胞相对地免受毒性作用。

[0443] 本发明的抗体可被内化到它们结合的病态或癌细胞内且因此对于治疗性应用是特别有效的,例如,向细胞内递送需要被内化以获得其不利活性的毒素。这些毒素的实例包括但不限于皂苷、卡奇霉素、阿里他汀与美登木素生物碱。

[0444] 本发明的抗体或多肽可共价或非共价地、直接或间接地与放射性分子、毒素或其他治疗剂、或包含治疗剂的脂质体或其他囊泡结合(包括偶联或连接)。抗体可与放射性分子、毒素或化疗性分子在沿该抗体的任何位置连接,只要抗体能够结合它的靶B7-H3。

[0445] 毒素或化疗剂可与合适的单克隆抗体共时施用(在施用之前、之后或在施用期间)或直接或间接地(例如,通过接头基团,或可选择地,通过具有合适的连接位点的连接分子,例如在美国专利第5,552,391号中所述的平台分子)与之偶联(例如,共价键合)。可使用本领域已知的方法将本发明的毒素和治疗剂直接偶联到特定的靶向蛋白上。例如,当剂和抗体各自具有能够与对方反应的取代基时,它们之间的直接反应是可能的。例如,一者上的亲核基团例如氨基或巯基可能能够与另一者上的含羰基的基团例如酸酐或酰基卤或与含良好的离去基团(例如,卤素)的烷基反应。

[0446] 这些抗体或多肽还可通过微载体与化疗剂连接。术语“微载体”指不溶于水并具有

小于约150μm、120μm或100μm大小，更常见地小于约50-60μm，优选地小于约10、5、2.5、2或1.5μm的尺寸的可生物降解或不可生物降解的颗粒。微载体包括“纳米载体”，纳米载体是具有小于约1μm，优选地小于约500nm的尺寸的微载体。这些颗粒是本领域已知的。固相微载体可以是由生物相容性的天然存在的聚合物、合成的聚合物或合成的共聚物形成的颗粒，这些固相微载体可包括或不包括由琼脂糖或交联的琼脂糖以及本领域已知的其他可生物降解的材料形成的微载体。可生物降解的固相微载体可由在哺乳动物生理条件下可降解的聚合物(例如，聚(乳酸)、聚(乙醇酸)和其共聚物)或易受侵蚀的聚合物(例如，聚(原酸酯)例如，3,9-二亚乙基-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷(DETOSU)或聚(酸酐)例如癸二酸的聚(酸酐))形成。微载体还可以是无抗原的液相(例如，基于油或脂质的液相)，例如脂质体、iscom(免疫刺激复合物，其是胆固醇和磷脂、佐剂活性的皂苷的稳定复合物)，或水包油或油包水型乳状液中存在的液滴或胶束，条件是该液相微载体是可生物降解的。可生物降解的液相微载体通常并入了可生物降解的油，其中许多是本领域已知的，包括角鲨烯和植物油。虽然在形状上微载体通常是球形的，但是偏离球形形状的微载体也是可接受的(例如，椭球、棒形等)。由于其不溶性性质(相对于水)，微载体可被从水和基于水的(含水的)溶液中过滤出来。

[0447] 本发明的抗体或多肽偶联物可包括包含能够与毒剂或治疗剂偶联的基团和能够与抗体偶联的基团的双官能接头。接头可起间隔区作用而将抗体与剂隔开以避免干扰结合能力。接头可以是可裂解或不可裂解的。接头还可以用来增加剂或抗体上的取代基的化学反应性，并由此增加偶联效率。化学反应性的增加还可增进剂或剂上的官能团的用途，否则这种用途将是不可能的。可通过本领域已知的手段将双官能接头偶联到抗体上。例如，包含活性酯部分例如N-羟基琥珀酰亚胺酯的接头可用于通过酰胺键与抗体中的赖氨酸残基偶联。在另一个实例中，包含亲核性的胺或肼残基的接头可与通过抗体的碳水化合物残基的糖酵解氧化产生的醛基团偶联。除了这些直接的偶联方法，接头还可借助于中间载体例如氨基葡聚糖间接地与抗体偶联。在这些实施方式中，修饰过的键合是经由赖氨酸、碳水化合物或中间载体。在一个实施方式中，接头被位点选择性地偶联到蛋白质中的游离硫醇残基。适合与蛋白质上硫醇基团选择性偶联的部分是本领域熟知的。实例包括二硫化物化合物、α-卤代羰基和α-卤代羧基化合物和马来酰亚胺。当亲核性的胺官能与α-卤代羰基或羧基存在于同一分子上时，存在通过胺的分子内烷基化发生环化的可能。防止该问题的方法是本领域普通技术人员熟知的，例如，通过制备一种分子，其中胺和α-卤素官能被不可弯曲的基团例如芳基或反式链烯烃隔开，这种不可弯曲的基团使得在立体化学上不支持不期望的环化。对于经由二硫键部分形成的美登木素生物碱和抗体的偶联物的制备，参见，例如，美国专利第6,441,163号。

[0448] 一种可用于制备抗体-药物偶联物的可裂解的接头是基于顺式乌头酸的酸不稳定性的接头，该接头利用了不同的细胞内区室例如受体介导的细胞内吞期间遇到的内体和溶酶体的酸性环境。参见，例如Shen,W.C.等人(1981)(“cis-Aconityl Spacer Between Daunomycin And Macromolecular Carriers:A Model Of pH-Sensitive Linkage Releasing Drug From A Lysosomotropic Conjugate,” Biochem.Biophys.Res.Comtnun.102:1048-1054(1981))的柔红霉素和大分子载体的偶联物的制备;Yang等人(1988)(“Pharmacokinetics And Mechanism Of Action Of A

Doxorubicin-Monoclonal Antibody 9.2.27Conjugate Directed To A Human Melanoma Proteoglycan,"J.Natl.Canc.Inst.80:1154-1159)的柔红霉素和抗黑色素瘤抗体的偶联物制备;Dillman等人(1988)("Superiority Of An Acid-Labile Daunorubicin-Monoclonal Antibody Immunoconjugate Compared To Free Drug,"Cancer Res.48:6097-6102)的以相似的方式使用酸不稳定的接头来制备柔红霉素和抗T细胞抗体的偶联物;和Trouet等人(1982)"A Covalent Linkage Between Daunorubicin And Proteins That Is Stable In Serum And Reversible By Lysosomal Hydrolases,As Required For A Lysosomotropic Drug-Carrier Conjugate:In Vitro And In Vivo Studies," Proc.Natl.Acad.Sci.(美国)79:626-629)的以通过肽间隔臂连接柔红霉素与抗体。

[0449] 本发明的抗体(或多肽)可通过本领域已知的任何方法偶联(连接)到放射性分子或毒素上。对于放射性标记抗体的方法的讨论(参见,Cancer Therapy with Monoclonal Antibodies, D.M.Goldenberg(编辑)CRC Press,Boca Raton,1995)。合适的毒素包括紫杉烷、美登木素生物碱、阿里他汀(例如,单甲基阿里他汀(MMAE)、单甲基阿里他汀F(MMAF)、阿里他汀E(AE)等)(例如在美国专利第5,208,020;5,416,064;6,333,410;6,340,701;6,372,738;6,436,931;6,441,163;6,596,757;7,276,497;7,585,857;或7,851,432号中公开的那些)、卡奇霉素、葸环类(例如,阿霉素)、CC-1065类似物、多西他赛;组织蛋白酶B或E;蓖麻毒素、多花白树毒蛋白、假单胞菌外毒素、白喉毒素和RNA酶;tiuxetan或毒性放射性同位素(例如,^{90}Y;^{131}I、^{177}Lu、^{186}Re、^{188}Re、^{211}At、^{212}Bi、^{213}Bi、^{225}Ac等)。

[0450] 可选择地,抗体可与第二抗体偶联以形成如美国专利第4,676,980号中所述的抗体复共轭对配合物。交联的抗体的形成可使免疫系统靶向到特定类型的细胞,例如表达B7-H3的癌细胞或病态细胞。

[0451] 本发明还提供了使用与化疗剂组合的或与化疗剂连接的结合B7-H3的抗B7-H3抗体或其他实施方式延迟转移在患癌症(包括但不限于前列腺癌、肺癌或肾癌)的个体内的形成。在某些实施方式中,抗体是非人类抗B7-H3抗体的人源化形式或嵌合形式。

[0452] 又在另一个实施方式中,该抗体可在手术去除表达抗原的癌症的时候用作辅助疗法以延迟转移的形成。该抗体或与化疗剂结合的抗体还可在手术之前施用到(新辅助疗法)具有表达抗原的肿瘤的个体内以减小肿瘤的尺寸并因此实现或简化手术,在手术期间节约组织和/或减少所致的缺损。

[0453] 又在另一个实施方式中,本文所述的B7-H3结合组合物中的任一种可结合表达B7-H3的癌性细胞并引发针对表达B7-H3的癌性细胞的主动免疫反应。在某些情况下,主动免疫反应可导致癌性细胞的死亡(例如,与癌细胞结合的抗体引发凋亡性细胞死亡)或抑制癌性细胞的生长(例如,阻碍细胞周期进展)。在其他情况下,本文所述的新型抗体中的任何一种可结合癌性细胞,且抗体依赖性的细胞毒性作用(ADCC)可去除抗B7-H3结合的癌性细胞。因此,本发明提供了刺激免疫反应的方法,该方法包括施用本文所述的组合物中的任何一种。

[0454] 在某些情况下,抗体结合还可活化细胞免疫反应和体液免疫反应并募集更多的自然杀伤细胞或增加进一步激活个体的免疫系统来破坏癌性细胞的细胞因子(例如,IL-2、IFN-γ、IL-12、TNF-α、TNF-β等)的产生。又在另一个实施方式中,抗B7-H3抗体可结合癌性细胞,且巨噬细胞或其他吞噬细胞可调理癌性细胞。

[0455] 抗B7-H3抗体或其片段的多种制剂可用于施用。在某些实施方式中,抗B7-H3抗体

或其片段可以以纯的形式施用。除了药理学上有效的剂，本发明的组合物可包含合适的药学可接受的载体，包括赋形剂和助剂，这些载体是本领域熟知的且是有助于药理学上有效的物质的施用或有助于将活性化合物加工成药学上可用于向作用位点递送的制剂的相对惰性的物质。例如，赋形剂可产生形状或稠度或起稀释剂作用。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿剂和乳化剂、用于改变渗透性的盐、包囊剂、缓冲剂和皮肤渗透增强剂。

[0456] 用于肠胃外施用的合适制剂包括水溶性形式的活性化合物例如水溶性盐的水溶液。另外，可施用适合用于油性注射悬浮液的活性化合物的悬浮液。合适的亲脂性溶剂或介质包括脂肪油例如，芝麻油或合成脂肪酸酯例如油酸乙酯或甘油三酯。含水注射悬浮液可包含增加悬浮液粘度的物质，且包括例如，羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。任选地，悬浮液还可包含稳定剂。脂质体也可用来包封待向细胞递送的剂。

[0457] 根据本发明的用于全身施用的药物制剂可被配制成用于肠内、肠胃外或局部施用。实际上，所有三种类型的制剂都可同时使用以实现活性成分的全身施用。Remington:The Science And Practice Of Pharmacy,第21版,Lippincott Williams&Wilkins Publishing(2005)中提供了用于肠胃外和非肠胃外药物递送的赋形剂以及制剂。用于口服施用的合适制剂包括硬质或软质的明胶胶囊、丸剂、片剂(包括包衣片剂)、酏剂、悬浮液、糖浆或吸入剂和其控释形式。通常，这些剂被配制成用于通过注射(例如，腹膜内、静脉内、皮下、粘膜内等)施用，但是其他形式的施用(例如，口服、经粘膜等)也可使用。因此，优选地将抗B7-H3抗体与药学可接受的介质例如盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液及类似物组合。

[0458] 具体的剂量方案，即，剂量、时间和重复，将取决于特定的个体及该个体的医疗史。通常，施用至少约100μg/kg体重、更优选地至少约250μg/kg体重、甚至更优选地至少约750μg/kg体重、甚至更优选地至少约3mg/kg体重、甚至更优选地至少约5mg/kg体重、甚至更优选地至少约10mg/kg体重的剂量。

[0459] 经验性考虑因素例如半衰期，通常将有助于剂量的确定。与人免疫系统相容的抗体例如人源化抗体或完整的人抗体可用来延长抗体的半衰期并保护抗体免受宿主免疫系统的攻击。可在治疗过程中确定并调整施用频率且施用频率基于减少癌性细胞的数量，维持癌性细胞的减少，减弱癌性细胞的增殖或延迟转移的形成。可选择地，持续的连续释放的抗B7-H3抗体的制剂可能是合适的。用于实现持续释放的多种制剂和装置是本领域已知的。

[0460] 在一个实施方式中，可根据经验确定已被给予一次或多次施用的个体的抗B7-H3抗体的剂量。给予个体增量剂量的抗B7-H3抗体。为评价抗B7-H3抗体的功效，可跟踪特定癌症病态的标志。这些包括通过触诊或视觉观察对肿瘤尺寸的直接测量，通过X-射线或其他成像技术对肿瘤尺寸的间接测量，如通过肿瘤样品的直接肿瘤活组织检查和显微镜检查评价的改善;间接肿瘤标志(例如，用于前列腺癌的PSA)的测量、疼痛或无力的减轻;改善的语言能力、视力、呼吸或与肿瘤有关的其他残疾;增加的食欲;通过公认的试验测量的生活质量的提高或存活期的延长。将对于本领域技术人员明显的是剂量将根据个体、癌症的类型、癌症的阶段、癌症是否已开始转移至个体的其他部位和过去使用的治疗与目前正使用的治疗而变化。

[0461] 其他制剂包括本领域已知的合适的递送形式，包括但不限于载体例如脂质体。参见，例如Mahato等人(1997)“Cationic Lipid-Based Gene Delivery Systems: Pharmaceutical Perspectives,”Pharm.Res.14:853-859。脂质体制剂包括但不限于细胞

转染剂、多层囊泡与单层囊泡。

[0462] 在某些实施方式中，可存在多于一种的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆抗体。这些组合物可包含针对癌、腺癌、肉瘤或腺肉瘤反应性的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同的抗体。抗B7-H3抗体可与针对器官(包括但不限于卵巢、乳房、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、骨、上消化道和胰)中的癌、腺癌、肉瘤或腺肉瘤反应性的一种或多种抗体混合。在一个实施方式中，使用了不同抗B7-H3抗体的混合物。如本领域经常提及的抗体混合物在治疗更广范围的种群的个体方面可能是特别有用的。

[0463] 现在已综述了本发明，通过参考被示例性地提供且不期望限制本发明(除非指明)的以下实施例，本发明将更易于理解。

[0464] 实施例1

[0465] 免疫组织相容性研究

[0466] 经肿瘤细胞/胎儿祖细胞免疫产生一组49种mAb。评价这些抗体相对于正常的非癌性组织表现出对肿瘤组织的差异性IHC染色的能力、在抗体功效的灵长类(且特别是食蟹猕猴)模型中使用的能力、亲和力与抗原特异性的水平及免疫调节活性与细胞内化的水平。通过MS分析和/或与B7-H3-CHO细胞的结合初步鉴定到21种mAb。剩余的28种mAb通过用B7-H3蛋白质经ELISA重新筛选文库来鉴定。表2中提供了该组49个成员中的46个的特征。

[0467]

表 2

名称	同种型	IHC	ATCC 阵列	内化	U-DART™	BIACORE™ 分析	食蟹猕猴 B7-H3 结合
BRCA84D	IgG1/k	2a	2	+	+	+	++
TDH6	IgG1/k	2a	1	+	+	+/–	+
TES7	IgG1/k	2a	1	+	+	+	–
BRCA68D	IgG1/k	2b	3	+	+	++	++
BRCA69D	IgG1/k	2b	3	+	+	++	++
GB8	IgG1/k	2b	3	+	+	+	++
SG27	IgG2b/k	2b	1		+	+	+
OVCA22	IgG1/k	2c	3	+	+	+/–	+
PRCA157	IgG1/k	2c	2	+	+		++
BLA8	IgG1/k	2c		+/–	+	++	++
KID35	IgG1/k	2c	2				++
LUCA50	IgG2a/k	2c	1			+	++
OVCA21	IgG1/k	2c	1		+	+	+
PRCA135	IgG1/k	2c	3		+		++
SG24	IgG2a/k	2c	3			++	++
TDH5	IgG1/k	2c	3		+	++	++
BCCA66	IgG1/k	2c	2		+		–
RECA13	IgG1/k	2c	3		+		–
RECA9	IgG1/k	2c	3		+		–
PRCA123	IgG1/k	2c/3	3		+		++
BRCA126	IgG1/k	3/F					
BRCA192	IgG1/k	3/F					
BRCA34	IgG1/k	3/F					
KID1	IgG1/k	3/F	ND	+	+		+
KID13	IgG2a/k	3/F	3				++
LU14	IgG2b/k	3/F					–
LUCA1	IgG1/k	3/F	1	+	+	++	++
MCLY42	IgG2a/k	3/F					++
MCLY46	IgG1/k	3/F					++
OVCA40	IgG1/k	3/F					++
PA20	IgG1/k	3/F		+		++	–
PA40	IgG2b/k	3/F	3				–
PA41	IgG1/k	3/F	3				
PRO6	IgG1/k	3/F	2				–
RECA22	IgG1/k	3/F	3		–		+
SAL3	IgG2a/k	3/F			+++		++
SG20	IgG1/k	3/F					+
SG29	IgG1/k	3/F					++
SKIN2	IgG1/k	3/F	3		+++		++

[0468]

表 2

名称	同种型	IHC	ATCC 阵列	内化	U-DART™	BIACORE™ 分析	食蟹猕猴 B7-H3 结合
STO5	IgG2b/k	3/F	3		++		+
TDH36	IgG1/k	3/F	2				++
TDH37	IgG1/k	3/F	3				+
TDH4	IgG1/k	3/F			+++	++	++
TDH40	IgG2b/k	3/F	3				++
TDH44	IgG2b/k	3/F					++
OVCA25	IgG1/k	3/F	3				+

[0469] IHC染色证实,在许多所鉴定到的抗体中,该组包括的抗体引发强烈的肿瘤与正常组织的结合差异,通过BIACORE™显示出一系列的结合特性,表现出对一系列的重叠和不重叠表位的反应性并显示出对4Ig相对2Ig B7-H3的一系列特异性。表3和表4中示出了九个最佳候选物的特征。

[0470]

表 3

名称	正常组织	结肠癌	肺癌	前列腺癌	乳腺癌
BRCA84D	结肠 1+ 肺 1+ 肝 1+	1231 *	1130	112	1111
TDH6	结肠 1+ 胰 1+ 肾 1+ 肺 1+ 肝 1+	1110 *	1010	111	1011
TES7		1.5	1.75	3	3
BRCA68D	胰 1+ 肾 1+ 肺 1+ 肝 2+	2321 *	3332	333	3333
BRCA69D	结肠 1+ 胰 1+ 肾 1+ 肝 1+	2231 *	3231	333	3333
GB8					
SG27	结肠 1+ 胰 1+ 肾 1+ 肝 1+	1221 *	1120	222	1122

[0471]

表 3					
名称	正常组织	结肠癌	肺癌	前列腺癌	乳腺癌
OVCA22	结肠 2+ 胰 2+ 肝 2+	1122	3131 **	222	3233
PRCA157	结肠 2+ 肝 2+ 皮肤 2+	2231 *	3231	333	2333
* 也是+基质; ** 基质 3+					

[0472]

表 4		
名称	2Ig/4Ig 特异性	表位组
BRCA84D	4Ig/2Ig	1
TDH6	4Ig/2Ig	2
TES7	4Ig	3
BRCA68D	4Ig/2Ig	4
BRCA69D	4Ig/2Ig	4
GB8	4Ig/2Ig	5
SG27	4Ig/2Ig	6
OVCA22	4Ig	7
PRCA157	4Ig/2Ig	8

[0473] 表5提供了对这些抗体的活性特征的总结。

[0474]

表 5							
名称	正常组织染色	肿瘤/正常差异	肿瘤组织阳性	食蟹猕猴交叉反应性	IHC *	结合 BIACORE™	UDART™ 活性
BRCA84D	1	1	肿瘤基质 bv	阳性 (非 1:1)	78	++	++
TES7	1	1	肿瘤基质 bv	阴性	1250	+	++
BRCA68D	3	3	肿瘤	阳性 (1:1)	20	+++	++
BRCA69D	3	3	肿瘤基质	阳性 (1:1)	20	+++	++
GB8	2/3 (肾上腺 ND)	3/4	肿瘤基质	ND, + 重组	625	+	+
SG27	2/3	ND	ND	ND, + 重组	20000	+	+

[0475]

表 5							
名称	正常组织染色	肿瘤/正常差异	肿瘤组织阳性	食蟹猕猴交叉反应性	IHC *	结合 BIACORE™	UDART™活性
OVCA22	1	1	肿瘤基质	阴性 + 重组	2500	+	++
PRCA157	2	3	肿瘤基质 bv	阳性 (1:1)	20	ND	++
*以 ng/ml 计的最佳浓度；ND，未测定							

[0476] 表6中所示的抗体活性分析揭示，其各自的特征不同且每种抗体都伴有彼此相对的优点和缺点(表6)。

[0477]

表 6		
抗体	优点	缺点
BRCA84D	#1 正常组织染色 #1 肿瘤/正常差异 对肿瘤、基质、BV 染色 中度亲和力，唯一的结合位点(可滴定的结合)	食蟹猕猴交叉反应性不是 1:1
BRCA68D	#3 正常组织染色 #3 肿瘤/正常差异 食蟹猕猴交叉反应性1:1 高亲和力 强效的 UDART™活性	只对肿瘤染色
BRCA69D	#3 正常组织染色 #3 肿瘤/正常差异 食蟹猕猴交叉反应性1:1 对肿瘤、基质染色 高亲和力 强效的UDART™活性	
PRCA157	#2 正常组织染色 #3 肿瘤/正常差异 食蟹猕猴交叉反应性1:1 对肿瘤、基质、BV染色 强效的UDART™活性	BIACORE™
TES7	#1/2 正常组织染色 #1/2 肿瘤/正常差异 对肿瘤、基质、BV染色 4Ig特异的 强效的UDART™活性	无食蟹猕猴交叉反应性 低亲和力
OVCA22	#1/2 正常组织染色 #1/2 肿瘤/正常差异，低亲和力	无食蟹猕猴交叉反应性 低亲和力

[0478]

表 6		
抗体	**优点**	**缺点**
	对肿瘤、基质染色 4Ig特异性的 强效的UDART™活性	
GB8	#2/3 正常组织染色(肾上腺未测定) #3/4 肿瘤/正常差异 对肿瘤、基质染色 中度的UDART™活性	食蟹猕猴交叉反应性未测定 低亲和力
SG27	#2/3 正常组织染色 肿瘤/正常差异未测定 中度的UDART™活性	食蟹猕猴交叉反应性未测定 低亲和力

[0479] 由于BRCA84D、BRCA68D、BRCA69D和PRCA157显示出较为干净的正常组织IHC特征，较强的肿瘤/正常IHC差异，中度到强的结合(BIACORE™/IHC)，与食蟹猕猴的B7-H3的交叉反应性和强效的DART™活性，这些抗体种类被选择用于进一步的研究。这些抗体不同于显示出低的亲和力(在BIACORE™测定中)且对食蟹猕猴的B7-H3无交叉反应性的TES7和OVCA2。这些抗体不同于表现出低的亲和力(在BIACORE™测定中)、差的IHC表现(弱结合)和较低的UDART™活性的SG27。这些抗体不同于显示出低的亲和力(在BIACORE™测定中)、差的肿瘤/正常IHC差异和较低的UDART™活性的GB8。

[0480] 使用Caki-2和Hs700T阳性对照细胞，IHC研究表明每种抗体相对于彼此表现出不同的最佳浓度和不同的差异浓度(表7)。

[0481]

表 7		
抗体	**最佳 IHC 浓度**	**差异 IHC 浓度**
BRCA84D	0.625 μg/ml	0.078 μg/ml
BRCA68D	0.156 μg/ml	0.0195 μg/ml
BRCA69D	0.156 μg/ml	0.0195 μg/ml
PRCA157	0.078 μg/ml	0.0195 μg/ml
TES7	5 μg/ml	1.25 μg/ml
OVCA22	10 μg/ml	2.5 μg/ml *
GB8	1.25 μg/ml	0.625 μg/ml
SG27	20 μg/ml	未测定**
TDH6	20 μg/ml	未测定***
* OVCA22 仅对 caki2 细胞表现出结合，未对 Hs700T 细胞表现出结合。优化决定基于对 caki2 细胞的结合。 ** 因为 SG27 在两位操作人员之间未表现出一致的滴定分析结果，所以未测定低的亲和力和差异浓度。		

[0482]

表 7		
抗体	**最佳 IHC 浓度**	**差异 IHC 浓度**
*** 由于对阳性对照细胞的亲和力太低，未进行 TDH6 研究。		

[0483] 使用表7中指出的最佳浓度和差异浓度，测定了B7-H3抗体在人组织中的IHC反应。表8A-8B和表9A-9B中示出了对肾上腺、肝、胰、肾、肺和结肠的这些分析的结果(所有抗体对心脏组织表现出阴性的IHC反应)。

[0484]

表 8A:最佳浓度下的 B7H3 mAb 在人组织中的 IHC			
mAb	**肾上腺**	**肝**	**胰**
BRCA84D 0.625 μg/ml	阴性	窦衬细胞++ 肝细胞+, 5-10%	上皮+ 5% 纤维++
BRCA68D 0.156 μg/ml	皮质+++	窦衬细胞++ 肝细胞++(m)	上皮+ 纤维++
BRCA69D 0.156 μg/ml	皮质+++	肝细胞++(m)	上皮+ 纤维++
TES7 5 μg/ml	皮质+	窦衬细胞+	上皮+ 5% 纤维++
OVCA22 10 μg/ml	皮质+	窦衬细胞++ 肝细胞+(m)	上皮+ 5% 纤维++
PRCA157 0.078 μg/ml	皮质++	窦衬细胞++ 肝细胞+(m)	上皮+ 5% 纤维++
GB8 1.25 μg/ml	未测定	窦衬细胞++ 肝细胞+(m)	上皮+ 纤维++

[0485]

表 8B: 最佳浓度下的 B7H3 mAb 在人组织中的 IHC			
mAb	**肾**	**肺**	**结肠**
BRCA84D 0.625 μg/ml	阴性	上皮+ (5-10%)	上皮+
BRCA68D 0.156 μg/ml	成纤维细胞+, 罕见	上皮+	粘膜++
BRCA69D 0.156 μg/ml	成纤维细胞+, 罕见	上皮+	粘膜+
TES7 5 μg/ml	阴性	阴性	上皮+
OVCA22 10 μg/ml	成纤维细胞+	阴性	上皮+
PRCA157 0.078 μg/ml	阴性	阴性	粘膜+
GB8 1.25 μg/ml	阴性	上皮+	粘膜+

[0486]

表 9A:差异浓度下的 B7H3 mAb 在人组织中的 IHC			
mAb	肾上腺	肝	胰
BRCA84D 0.078 μg/ml	阴性	窦衬细胞+	纤维 +(罕见)
BRCA68D 0.0195 μg/ml	皮层 ++	肝细胞+(m)	纤维 +
BRCA69D 0.0195 μg/ml	皮层 ++	肝细胞+(m)	纤维 +
TES7 1.25 μg/ml	成纤维细胞 +	窦衬细胞+	上皮+, 5% 纤维 ++
OVCA22 2.5 μg/ml	成纤维细胞 +	窦衬细胞+	纤维 +
PRCA157 0.0195 μg/ml	未测定	窦衬细胞+ 肝细胞+(m)	纤维 +
GB8 0.625 μg/ml	未测定	窦衬细胞++ 肝细胞+(m)	纤维 +

[0487]

表 9B: 差异浓度下的 B7H3 mAb 在人组织中的 IHC			
mAb	肾	肺	结肠
BRCA84D 0.078 μg/ml	阴性	阴性	上皮+
BRCA68D 0.0195 μg/ml	阴性	血纤蛋白+(罕见)	粘膜+
BRCA69D 0.0195 μg/ml	阴性	阴性	粘膜+
TES7 1.25 μg/ml	阴性	阴性	上皮+
OVCA22 2.5 μg/ml	阴性	阴性	上皮+
PRCA157 0.0195 μg/ml	阴性	阴性	粘膜+
GB8 0.625 μg/ml	阴性	阴性	粘膜+

[0488] 使用癌症样本进行的IHC研究表明本发明的B7-H3抗体可用来鉴定和诊断多种组织来源内的癌症(表10)。在表10中,数字表示加号的数量(1=+,2=++,3=+++);每个数字指不同的受试样品。

[0489]

表 10					
mAb	μg/ml	前列腺癌	乳腺癌	肺癌	结肠癌
BRCA84D	0.625 μg/ml	2, 2, 1	3, 3, 3, 3	2, 3, 2(基	2(基质), 3, 3,

[0490]

				质), 1(b.v.)	3(基质)
	0.078 μg/ml	0, 2, 3, 2	1(基质), 1(基质), 1(基质), 2, 3	1, 1, 0, 1	2, 2(基质), 1(基质), 2(基质)
BRCA68D	0.156 μg/ml	2, 3, 3, 3	2, 3, 3, 3, 3	3, 3, 2, 2	3, 3, 3, 3
	0.0195 μg/ml	0, 1, 1, 1	0, 0, 2, 2, 1	0, 1, 1, 0	1, 1, 1, 1
BRCA69D	0.156 μg/ml	3, 3, 3	3, 3, 3, 3, 3	3, 3, 2, 2(基质)	3, 3, 3, 3
		0, 1, 2, 1	1, 2, 1, 1	1, 1, 0, 1	1(b.v.), 2(基质), 1, 1
GB8	1.25 μg/ml	2, 3, 1	2, 2, 1, 2	3, 3, 0, 0	2(基质), 2, 2, 2
	0.625 μg/ml	0, 1, 1	0, 0, 0, 0, 1	1, 0, 0, 0	1(基质), 1(基质), 0, 0
TES7	5 μg/ml	2, 3, 2, 3	1(基质), 3, 3, 3, 2	3, 2, 1(基质), 1(b.v.)	3, 3, 2, 2
	1.25 μg/ml	1, 2, 2, 3	1(基质), 2, 3, 3, 2	3, 1, 1(基质), 1(b.v.)	3, 2(基质), 2(基质), 2
OVCA22	10 μg/ml	3, 2, 2, 1	1(基质), 2, 2, 3, 3	3, 2, 1(基质), 0	1(基质), 1, 1, 2(基质)
	2.5 μg/ml	1, 1, 3, 1	1(基质), 1(基质), 1(基质), 3, 2, 2	2, 1, 0, 0	1, 0, 2(基质), 0
PRCA157	0.078 μg/ml	2, 2, 2, 3	1, 2, 2, 3, 3	2, 2, 1(基质), 1(b.v.)	3, 3, 2(基质), 2(基质)
	0.0195 μg/ml	0, 1, 2, 1	1(基质), 0, 2, 1(基质)	0, 1, 0, 0	1, 1, 1(基质), 1(基质)

[0491] 对于用B7-H3抗体BRCA84D处理的前列腺癌、乳腺癌、结肠癌和肺癌细胞，肿瘤样品染色存在于肿瘤细胞和基质细胞内，包括肿瘤的脉管系统。在某些肿瘤样品中，基质染色比肿瘤细胞强得多。当BRCA84D mAb滴定至更低浓度时，某些实例显示出肿瘤细胞内的染色减少，但仍维持强的基质染色。经用0.625μg/ml的BRCA84D染色后，前列腺癌细胞显示出3/3+的IHC；乳腺癌细胞显示出4/4+的IHC；结肠癌细胞显示出4/4+的IHC且肺癌细胞显示出4/4+的IHC。经用0.078μg/ml的BRCA84D染色后，前列腺癌细胞显示出3/4+的IHC；乳腺癌细胞显示出5/5+的IHC；结肠癌细胞显示出4/4+的IHC且肺癌细胞显示出3/4+的IHC。

[0492] 用B7-H3抗体BRCA68D处理正常的肝，并在肝细胞和窦衬细胞中看到染色。用B7-H3抗体BRCA68D染色的正常的胰在胶原纤维和上皮中显示出多灶性染色。用B7-H3抗体BRCA68D处理的正常的肾上腺细胞在皮质中显示出染色。经用0.156μg/ml的BRCA68D染色后，胃癌、肾癌和卵巢癌细胞都显示出5/5+的IHC。

[0493] 对胃癌、肾癌和卵巢癌组织的样品进行了另外的IHC染色分析。表12中示出了这些分析的结果。在表11中，数字表示加号的数量(1＝+,2＝++,3＝+++)；每个数字指不同的受

试样品。

[0494]

表 11

mAb	μg/ml	胃癌	肾癌	卵巢癌
BRCA84D	0.625 μg/ml	2,1,2,2,2	1,2,1,1,1	0,3,1,2,2
	0.078 μg/ml	1,0,0,1,0	0,1,0,1,0,1	0,2,0,1,1
BRCA68D	0.156 μg/ml	3,2,3,3,3	3,3,2,3,3,3	2,3,3,2,2
	0.0195 μg/ml	2,1,2,1,1	2,2,2,2,2,2	1,2,2,1,1
OVCA22	10 μg/ml	3,1,3,1,1	3,1,2,3,0,2	2,3,2,1,1
	2.5 μg/ml	2,0,2,1,0	2,1,1,2,0,1	1,2,1,0,1
TES7	5 μg/ml	2,1,3,2,1	2,3,1,2,2,1	1,3,1,2,2
	1.25 μg/ml	2,0,2,1,1	2,2,1,1,1,1	1,3,1,2,2

[0495] 总之，所有的受试mAb在正常的肝、胰、结肠和肺中显示出不同程度的染色强度。图1A示出了使用正常的胰、肝、肺和结肠组织样本以0.625μg/ml和0.078μg/ml的BRCA84D进行IHC研究的结果。对于BRCA84D和TES7，肝染色相对局限于窦衬细胞(成纤维细胞和库弗细胞(kupffer cells))。在最佳浓度下，除了窦衬细胞的膜染色，OVCA22显示出膜性肝细胞染色。然而，肝细胞染色在差异浓度下消失。所有的其他mAb在最佳浓度和差异浓度下都显示出肝细胞染色，包括膜染色或胞质染色。主要在胶原纤维和小百分比的上皮(腺泡细胞或/和闰管细胞)中观察到胰染色。上皮染色在差异浓度下减少或消失。结肠染色相对地局限在腺窝上皮的顶端膜和粘膜中的成纤维细胞。未在结肠的淋巴结内观察到结合。对于BRCA84D、BRCA68D、BRCA69D和GB8，肺显示出上皮内的非常弱且呈片状的染色。然而，染色在差异浓度下消失。对于TES7、OVCA22和PRCA157，在两种浓度下都没有观察到肺染色。除了BRCA84D，对于几乎所有的mAb，在最佳浓度下都观察到肾上腺皮质染色。对于差异浓度下的TES7和OVCA22，肾上腺染色明显减少。心脏和肾对所有的mAb都未显示出明显的染色(图1B)。鉴于这些特性，BRCA84D被认为是这些mAb中最佳的，之后依次是(2)TES7、(3)OVCA22、(4)BRCA68D、BRCA69D和PRCA157的组，且最后是(5)GB8。

[0496] 在最佳浓度下，该研究中包括的所有mAb在4种癌症类型中都表现出阳性染色。在差异浓度下，BRCA84D仍在前列腺癌、乳腺癌和结肠癌中保持良好的染色。TES7在4种所研究的癌症类型中保持良好的染色。剩余的mAb在不同的肿瘤类型中表现出不同的染色强度。在肿瘤细胞和基质细胞，包括脉管系统中观察到肿瘤样品染色。某些肿瘤样品仅在脉管系统中表现出阳性染色，即BRCA84D、BRCA69D、TES7和PRCA157。某些肿瘤表现出比肿瘤细胞染色强的基质染色。当在这些样品上mAb被滴定到更低的浓度时，某些实例表现出肿瘤细胞中的染色减少或未染色，但仍保持强的基质染色。总的来说，根据在人正常组织中的表达和在正常对肿瘤组织中的差异表达，从最佳IHC表现到最差表现的mAb顺序如下：(1)BRCA84D，(2)TES7，(3)OVCA22，(4)BRCA68D、BRCA69D和PRCA157的组，且最后是(5)GB8。表12和图2示出了抗体BRCA84D的结果。

[0497]

表 12		
癌组织类型	BRCA84D 0.625 μg/ml	BRCA84D 0.078 μg/ml
前列腺	3/3+	3/4+
乳房	4/4+	5/5+
结肠	4/4+	4/4+
肺	4/4+	3/4+

[0498] 实施例2

[0499] 食蟹猕猴B7-H3交叉反应性

[0500] 食蟹猕猴B7-H3的序列与其人类对应物共享约90％的同源性，表明食蟹猕猴是用于人B7-H3相互作用的极佳模型。进行了研究以评价B7H3候选物BRCA84D、BRCA68D、BRCA69D、TES7、OVCA22和PRCA157与食蟹猕猴的肾上腺、肝、肾、胰和肺以及一例足月胎盘的交叉反应性，以将任何交叉反应性和对于人组织所观察到的染色强度及染色模式进行比较。

[0501] 每种受试Mab的染色浓度是在Caki-2和Hs700T阳性对照细胞中确定的最佳浓度(参见，表8)。商购山羊抗人B7-H3(与食蟹猕猴交叉反应)被选择为阳性对照抗体来对食蟹猕猴胎盘组织染色。在每种实验运行中应用对应的同种型对照。表13中示出了这些研究的结果。

[0502]

表 13

mAb	肾上腺(2)	肝(2)	胰(2)	肾(2)	肺(2)	胎盘(1)
BRCA84D 0.625 μg/ml	阴性	阴性	阴性	阴性	1/2 上皮 1+	蜕膜细胞 2+ 间充质细胞 阴性
BRCA68D 0.156 μg/ml	皮质 3+	2/2 肝细胞 1+(m) 窦衬细胞 1+	1/2 纤维 2+ 上皮 1+	成纤维细胞 1+	阴性	蜕膜细胞,绒毛, 间充质细胞 3+
BRCA69D 0.156 μg/ml	皮质 2+	1/2 肝细胞 1+(m)	1/2 上皮 1+	成纤维细胞 1+ 罕见	阴性	蜕膜细胞 2+,绒毛, 间充质细胞 2+
TES7 5 μg/ml	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
OVCA22 10 μg/ml	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
PRCA157 0.078 μg/ml	皮质 1+	1/2 肝细胞 1+(m)	阴性	阴性	阴性	蜕膜细胞 2+,绒毛, 间充质细胞 1+
注释：在多达 5 μg/ml 下，BRCA84D 在肝和胰中表现出阴性染色。虽然在 IHC 中 OVCA22 未结合食蟹猕猴组织，但观察到对 CHO 细胞上的重组食蟹猕猴 B7H3 的中度结合。在正常组织中，IHC 得分为阴性、1+、2+和 3+的 4 级别系统；m=膜 2/2=2 例中有 2 例，½=2 例中有 1 例。						

[0503] 对食蟹猕猴胎盘中的BRCA84D(0.625μg/ml)IHC染色的研究在蜕膜细胞中显示出染色,而在绒毛中未显示出染色。在食蟹猕猴的肝和胰中未观察到染色,但是,在人的肝观察到窦衬细胞的染色并在人的胰腺组织中观察到局部的纤维和上皮染色。

[0504] 对食蟹猕猴胎盘中的BRCA68D(0.156μg/ml)IHC染色的研究在蜕膜细胞、间充质细胞(内皮和成纤维细胞)和绒毛中显示出染色。在肝细胞的膜和肝成纤维细胞的胞质以及在胰纤维和在胰上皮细胞的胞质中存在染色。因此,人和食蟹猕猴的肝和胰腺组织对BRCA68D显示出相似的染色模式。

[0505] 总之,BRCA84D、BRCA68D、BRCA69D和PRCA157都在食蟹猕猴组织中表现出交叉反应性。BRCA84D在猴的肝和胰中未表现出染色;在人的肝和胰腺组织中观察到这种染色。BRCA68D和BRCA69D在猴的组织中表现出相似的染色强度和染色模式。虽然BRCA68D、BRCA69D和PRCA157在最佳条件下表现出与人的组织相当的染色模式,但染色强度与人组织不同。在最佳条件下,TES7和OVCA22未在猴组织中表现出任何染色。

[0506] 表14中提供了对食蟹猕猴组织和人组织中的IHC染色的对比结果的总结。

[0507]

表 14						
mAb	肾上腺	肝	胰	肾	肺	胎盘
BRCA84D 0.625 μg/ml 食蟹猕猴	阴性	阴性	阴性	阴性	1/2 上皮 1+	蜕膜细胞 2+ 间充质细胞 阴性
BRCA84D 0.625 μg/ml 人	阴性	2/2 窦衬细胞 2+，肝细胞 1+ 5-10%	上皮 1+, 5%, 纤维 2+	阴性	上皮 1+, 5-10%	蜕膜细胞 1+，绒毛、间充质细胞 1+
BRCA68D 0.156 μg/ml 食蟹猕猴	皮质 3+	2/2 肝细胞 1+(m) 窦衬细胞 1+	1/2 纤维 2+ 上皮 1+	成纤维细胞 1+	阴性	蜕膜细胞、绒毛、间充质细胞 3+
BRCA68D 0.156 μg/ml 人	皮质 3+	窦衬细胞 2+，肝细胞 2+(m)	上皮 1+ 纤维 2+	成纤维细胞 1+ 罕见	上皮 1+	蜕膜细胞 3+，绒毛、间充质细胞 3+
BRCA69D 0.156 μg/ml 食蟹猕猴	皮质 2+	1/2 肝细胞 1+(m)	1/2 上皮 1+	成纤维细胞 1+ 罕见	阴性	蜕膜细胞 2+，绒毛、间充质细胞 2+
BRCA69D 0.156 μg/ml 人	皮质 3+	肝细胞 2+(m)	上皮 1+ 纤维 2+	成纤维细胞 1+ 罕见	上皮 1+	蜕膜细胞 3+，绒毛、间充质细胞 3+
PRCA157 0.078 μg/ml 食蟹猕猴	皮质 1+	1/2 肝细胞 1+(m)	阴性	阴性	阴性	蜕膜细胞 2+，绒毛、间充质细胞 1+

[0508]

PRCA157 0.078 μg/ml 人	皮质 2+	窦衬细胞 2+，肝细胞 1+(m)	上皮 1+ 5% 纤维 2+	阴性	阴性	未测定

[0509] 实施例3

[0510] B7-H3mAb结合多种ATCC癌细胞系

[0511] 发现本发明的抗体能够结合美国典型培养物保藏中心的保藏物中包含的多种癌细胞系。表15和表16总结了结合的结果。

[0512]

表 15					
	抗体				
细胞系	BLA08	BRCA68D	BRCA69D	BRCA84D	PRCA157
正常人细胞系					
HMEC	++/+++	+++	+++	++	
HUVEC	ND	++	+/++	+/–	+/++
人乳腺癌细胞系					
BT474	+++	++	++/+++	+/++	++/+++
MCF7	+++	++	++/+++	+	++
MDA175	ND				
MDA361	ND	++		+/+/–	++
SKBR3	+++		++		
人肺癌细胞系					
A549	+++	+/+/–	+/–		+/–
Calu3	+++	+/++	+		+/++
SKMES1	+++	++	++/+++	+/++	++
人卵巢癌细胞系					
ES-2	+++	+/–			
SKOV3	+++	++	+/++	+/+/–	++
人胰腺癌细胞系					
Panc-1	++/+++	+/++	+/++	+/+/–	+/++
AsPC-1	+++				
HPAFII	+++				
Hs700T	+++	++/+++		+++	+++
人结肠癌细胞系					
Colo205	ND				
HT-29	+++	+	+		+
SW480	+++	+/–		+/–	
SW948	ND	+	+		
人肾癌细胞系					
293	+++	++	++	+	++/+++
786-0	+++	++	++	+	++/+++

[0513]

A498	+++	++	++	++	++/+++
Caki2	+++	+++	+++	++	++/+++
非人类的细胞系					
Cos7	+++	+	+/++	+/–	+/++
RL65	–				
SVT2	ND				
人前列腺癌细胞系					
22Rv1	+++				
DU145	+++	+	+	+	+/+/–
LNCaP	+++	++	++	+/++	++/+++
PC3	+++	+/+/–	+/–	+/–	+/–
TDH	ND	+/+/–	+/+/–		+
人胃癌细胞系					
HS746T	ND	+/++	+/++	+	++
N87	ND	+/++	+/++	+/–	+/++

[0514]

表 16					
	抗体				
细胞系	TDH06	OVCA22	GB8	SG27	TES7
正常人细胞系					
HMEC					
HUVEC	+/++/–		+/–	+/–	
人乳腺癌细胞系					
BT474	+/++	+	++	+/++	+/++
MCF7	+	+	++	+/+/–	+
MDA175		++			
MDA361	+/++/–				+
SKBR3		++			
人肺癌细胞系					
A549					
Calu3			+		
SKMES1	+/++	+/–	+/++	+	+
人卵巢癌细胞系					
ES-2					
SKOV3	+				+/+/–
人胰腺癌细胞系					
Panc-1	+/++/–		+	+/–	+/+/–
AsPC-1					
HPAFII		+			
Hs700T	+	+++	+++	+	+++
人结肠癌细胞系					
Colo205		+			

[0515]

HT-29	+	+/+/–			+/+/–
SW480	+/–	+++			
SW948	+/–	+			
人肾癌细胞系					
293	+/+/–		+	+/+/–	+
786-0	+		+*	+/–	+
A498	+		+/++		+/++
Caki2	++	+	+++	+/++	++
非人类的细胞系					
Cos7	+		+/+/– *	+/–	
RL65					
SVT2					
人前列腺癌					
22Rv1		+			
DU145	+/–	+			
LNCaP	+/+/–	+	+*	+/+/–	+
PC3					
TDH		+++	+/–		+/–
人胃癌细胞系					
HS746T	+		+/+/–	+/–	+/–
N87		+/+/–	+/–		

[0516] 实施例4

[0517] B7-H3mAb再导向杀伤

[0518] 本发明的抗体结合癌细胞表面上存在的B7-H3。如上所述，使用传统方法，可用荧光素标记这些抗体。当在具有结合T细胞受体的表位结合结构域和结合荧光素的表位结合结构域的UDART™分子(“TCR-UDART™”)的存在下孵育这些标记过的分子时，这些标记过的分子可结合DART™分子并从而将其定位到表达B7-H3的细胞的表面并引起再导向杀伤。

[0519] A.A498肾癌细胞的再导向杀伤

[0520] 为阐释这种再导向杀伤，将荧光素标记的B7-H3抗体与这些TCR-UDART™分子一起孵育并评价这些分子介导A498肾癌细胞的细胞毒性的能力(表17)。基于所达到的结果，最佳的候选物被推断为：RECA13、BRCA68D、BRCA69D和TDH6。

[0521] **表 17: A498 肾癌细胞的再导向杀伤**

[0522]

mAb	无 UDART™	具有 TCR-UDART™	FACS
	平均值	平均值	MFI
BCCA66	-1.04	46.39	43.30
BLA8	1.35	49.19	50
BRCA165	0	5.11	5.46
BRCA52	0	55.53	41.7
BRCA68D	0	36.89	83.7
BRCA69D	0	54.71	84.1
BRCA84D	0	72.40	30.6
GB8	4.00	42.00	17.9
KID1	0.38	52.08	18.5
KID13	26.39	58.20	
KID35	-1.68	7.62	
LUCA1	9.85	52.73	52.9
OVCA21	-0.85	47.59	6.04
OVCA22	0.36	38.66	53.9
OVCA25	-2.86	16.70	
PA40	-0.46	40.54	
PRCA123	0	56	130
PRCA135	0	55	127
PRCA157	0	39.14	58.8
RECA13	0	38.62	39.8
RECA22	-0.24	51.74	99.90
RECA9	0	62	50.1
SAL3	4.94	52.23	60.5
SG24	-2.25	42.00	
SG27	-3.98	0.21	
SKIN2	3.11	56.44	45.8
STO5	2.91	37.84	36.7
TDH36	-1.03	53.52	155.00
TDH37	0.05	65.21	47.50
TDH4	5.09	50.63	45.9
TDH40	-0.65	44.55	
TDH5	2.92	49.60	28.8
TDH6	0	70.10	19.5
TES7	6.23	52.89	17.5

[0523] 将A498肾癌细胞与不同浓度的针对B7-H3反应性的单克隆抗体一起孵育以确定抗体介导的剂量依赖性的再导向杀伤。实验结果(图3A-3B)表明再导向杀伤是剂量依赖性的。

[0524] B.A549肺癌细胞的再导向杀伤

[0525] 为进一步阐释这种再导向杀伤,将荧光标记的B7-H3抗体与上述TCR-UDART™分子或与具有结合CD16的表位结合结构域和结合荧光素的表位结合结构域的UDART™分子(“CD16-UDART™”)一起孵育并评价这些分子介导A549肺癌细胞的细胞毒性的能力(表18)。

实验结果(图3C-3D)表明再导向杀伤是剂量依赖性的。基于所达到的结果,最佳的候选物被推断为:BLA8、BRCA68D、BRCA69D和BRCA84D。

[0526]

表 18: A549 肺癌细胞的再导向杀伤				
mAb	无 DART™	具有 TCR-UDART™	具有 CD16-UDART™	FACS
	平均值	平均值	平均值	MFI
BCCA66	1.89	25.17	8.22	36.1
BLA8	-7.70	10.97	3.68	34.7
BRCA52	0	27.63		37
BRCA68D	-4.42	13.45	15.95	58.3
BRCA69D	0	24.25		60.5
BRCA84D	0	15.33		25
GB8	-8.68	2.44	-4.65	17
KID1	0	22.93		41
LUCA1	0	14.65		53
OVCA21	-2.43	18.90	7.22	31.5
OVCA22	0	32.90		61
PRCA123	7.68	29.88	17.31	79.4
PRCA135	-6.58	22.72	8.14	75.6
PRCA157	0.02	18.63	18.24	44.3
PSMA	-0.70	5.58	9.94	
RECA13	0.86	17.39	11.90	34.4
RECA22	3.71	20.49	19.35	74.3
RECA9	7.01	26.89	31.80	44.3
SAL3	0	31.80		67.4
SKIN2	-0.08	8.65	9.33	41.9
STO5	-10.36	9.28	1.71	54.7
TDH36	6.79	24.12	24.08	107
TDH37	6.93	22.57	23.37	42.3
TDH4	-6.26	10.07	2.21	32.4
TDH40	4.87	22.01	24.90	53.3
TDH5	-5.08	9.35	-2.85	27.1
TDH6	0	19.09		21.3
TES7	0	19.35		15.7

[0527] C.LNcap前列腺癌细胞的再导向杀伤

[0528] 为进一步阐释这种再导向杀伤,将荧光标记的B7-H3抗体与上述TCR-UDART™分子或与具有结合CD16的表位结合结构域和结合荧光素的表位结合结构域的UDART™分子("CD16-UDART™")一起孵育并评价这些分子介导LNcap前列腺癌细胞的细胞毒性的能力(表19)。基于所达到的结果,最佳的候选物被推断为:BRCA68D、BRCA69D、BRCA84D和PRCA157。

[0529]

表 19: LNcap 前列腺癌细胞的再导向杀伤				
mAb	无 DART™	具有 TCR-UDART™	具有 CD16-UDART™	FACS
	平均值	平均值	平均值	MFI
BCCA4	-2.96	13.29	2.47	5.1
BCCA66	-2.13	13.42	16.40	41
BLA8	4.32	14.97	24.00	48.4
BRCA165	3.59	57.26	12.02	7.6
BRCA183D	-4.65	43.09	35.30	7.6
BRCA52	32.34	71.23	48.28	42.5
BRCA68D	-1.40	23.00	21.91	86.9
BRCA69D	40.08	78.02	60.55	92.4
BRCA84D	20.11	78.70	41.27	16.4
GB8	-6.25	14.04	10.76	22
KID1	54.65	91.87	67.86	44.8
KID13	15.86	69.21	47.85	
KID133	27.51	45.65	47.12	120
KID24	-4.26	34.13	41.17	14.5
KID35	14.17	64.01	33.05	
KID47	11.34	39.49	15.02	10.8
KID8	16.98	58.80	34.77	5.5
LUCA1	47.40	89.31	67.15	73
LUCA17	23.18	26.90	35.87	11.1
LUCAT1	8.25	22.36	21.49	6.9
LUCAT7	26.50	38.29	44.77	8.7
MCL12	26.62	35.59	46.38	17.6
MEL2	6.57	29.90	31.40	19
OVCA21	12.07	26.81	31.30	41
OVCA22	45.09	96.50	77.30	113
OVCA25	16.14	63.26	32.39	
PA22	1.73	57.70	9.89	8.9
PA33	8.99	34.49	48.14	9.4
PA40	38.42	73.07	63.65	
PRCA123	9.96	14.39	18.38	125
PRCA135	-3.75	8.89	13.64	123
PRCA157	1.05	17.07	15.43	16.4
PSMA	11.52	31.38	34.79	

[0530]

表 19: LNcap 前列腺癌细胞的再导向杀伤				
mAb	无 DART™	具有 TCR-UDART™	具有 CD16-UDART™	FACS
	平均值	平均值	平均值	MFI
PSMA	52.82	71.19	66.04	
RECA13	5.86	22.55	15.40	37
RECA22	7.33	24.65	23.54	22.5
RECA9	27.67	52.54	45.14	5.3
SAL1	2.76	17.87	44.52	6.5
SAL2	8.71	30.68	29.17	14.5
SAL3	43.79	92.60	76.46	105
SG24	12.64	66.82	44.99	
SG27	1.37	55.30	16.96	
SKIN2	-2.04	14.81	24.23	73.8
SPL16	9.97	29.90	23.74	5.2
STO5	-1.48	21.11	24.97	61.3
TDH28	-4.23	18.55	15.04	13.3
TDH36	3.58	19.61	19.79	199
TDH37	7.90	18.78	25.22	57.3
TDH4	14.48	37.96	54.64	45.2
TDH40	8.51	44.55	43.87	79.3
TDH5	7.35	48.71	38.15	29.1
TDH6	4.50	54.59	19.73	41.7
TES7	50.15	94.47	73.40	22.4

[0531] 实施例5

[0532] B7-H3mAb结合可溶性B7H3-2Ig与可溶性B7H3-4Ig的能力

[0533] 如以上讨论的,B7-H3以包含4Ig结构域的形式(B7H3-4Ig)和包含2Ig结构域的形式(B7H3-2Ig)两种形式存在。测试了本发明抗B7-H3抗体结合可溶性B7H3-2Ig(图4A)和可溶性B7H3-4Ig(图4B)的B7-H3的能力。发现抗体显示出宽范围的结合特征。发现抗体PRCA123、TDH5、BLA8、BRCA68D和SG24对可溶性B7H3-2Ig显示出最强结合且发现抗体TES7、LUCA50、BRCA165、OVCA22、STO9和PA20对可溶性B7H3-2Ig显示出最弱结合。发现抗体PRCA123、BRCA69A、BLA8和BRCA68D对可溶性B7H3-4Ig显示出最强结合且发现抗体TES7、OVCA21、BRCA165和STO9对可溶性B7H3-4Ig显示出最弱结合。

[0534] 实施例6

[0535] 溶液中的抗原对被捕获的单克隆抗体的亲和结合

[0536] 为了阐释溶液中的抗原与被捕获的单克隆抗体之间的结合亲和力,将抗体以100-200RU的水平捕获在固定的IgG Fc-特异性Fab2片段上。将抗原B7-H3和B7-H3(4Ig)以100nM的浓度(流速20μl/min,持续120sec)注射到被捕获的抗体上并测量结合。将结合反应标准化为被捕获的mAb的相同水平并减去作为空白的对m2B6抗体(mIgG1)对照的结合反应。该分析的结果(图5A-5S;实线;B7-H3(4Ig)100nM;虚线;B7-H3,100nM)表明本发明的抗体对B7-H3(4Ig)表现出强的结合。

[0537] 实施例7

[0538] BIACORE™分析:B7-H3mAb滴定固定化B7-H3

[0539] 为了阐释B7-H3-2Ig和B7-H3-4Ig对本发明的抗体的相对结合亲和力,进行了BIACORE™分析。允许本发明的B7-H3抗体结合固定的B7-H3-2Ig或B7-H3-4Ig并随时间推移评价结合的滴度(图6A-6I)。发现TDH5、PRCA123、BLA8、BRCA69对B7-H3-2Ig和B7-H3-4Ig都具有高的亲和力。然而发现其表位大部分被埋在B7-H3-4Ig分子内,只有少量是可用的。发现OVCA22对B7-H3-2Ig和B7-H3-4Ig都具有非常低的亲和力,其表位在这两种分子上的可用度相同。但是,可能只有B7-H3-4Ig形式为抗体的二价结合(低解离速率)提供了足够的接近度,而B7-H3-2Ig只能被单价地结合。发现以该形式TDH6几乎没有任何亲和力,与2Ig的结合可能是非特异性的。发现TES7和PA20是具有低亲和力的B7-H4-4Ig特异性抗体。TES7可能具有低的结合速率和比PA20高的解离速率。发现BRCA84D是中间亲和力的抗体,可能对B7-H3-2Ig和B7-H3-4Ig都具有多个结合位点。基于BIACORE™分析,BRCA84D由于其不常见的结合位点而被认为是优选的抗体。TES7和PA20以及一种高亲和力-低特异性的抗体(例如,BRCA69D或另一种抗体)被认为是特异性结合高密度抗原表面的候选物。

[0540] 图7提供了抗体PRCA157、BRCA69D、BLA8、PA20、BRCA84D、GB8和SG27的对比BIACORE™分析,表明本发明的抗B7-H3抗体可显示出一系列的结合特性。

[0541] 图8示出了本发明的几种抗B7-H3抗体的非竞争性特异性。在实验中,在抗体BRCA84D的存在下孵育人B7-H3分子并进行BIACORE™分析。约3分钟后,向该反应中加入第二种抗B7-H3抗体。如果第二种抗体与BRCA84D竞争,将发现B7-H3位点封闭且不能够结合。结果表明抗体BRCA68D、BRCA69D和PRCA157不与BRCA84D竞争结合人B7-H3。

[0542] 实施例8

[0543] 抗B7-H3mAb内化到CSC和ATCC细胞系上

[0544] 研究了本发明的抗B7-H3抗体在结合癌细胞后被内化的能力。将前列腺CSC细胞和Hs700t胰细胞与抗B7-H3抗体一起孵育。在偶联皂草毒蛋白的抗小鼠二抗(如果结合到一抗上并被内化将对细胞产生毒性)的存在下孵育之后,测定细胞的成活力。对前列腺CSC细胞(图9A)和Hs700t胰细胞(图9B)的该研究结果表明了本发明的抗体被内化到细胞内的能力。

[0545] 实施例9

[0546] 通过ELISA分析B7-H3mAb的结合和交叉阻碍

[0547] 为了探索本发明的抗体与被这些抗体识别的表位之间的交叉反应性,测量了在竞争性B7-H3抗体的存在下发生的结合程度。该分析的结果示出在图10A-10F中,并表明BRCA68D与BRCA69D竞争。还发现TES7和OVCA22互相竞争,但发现TES7也与BRCA68D和BRCA69D竞争,而OVCA22没有。发现GB8与SG27竞争结合B7-H3-2Ig而不竞争结合B7-H3-4Ig。数据被总结在表20中且表明了B7-H3-4Ig的至少四个不同的表位(即,被SG27识别的表位、被GB8识别的表位、被OVCA22和TES7识别的表位及被BRCA68D、BRCA69D和TES7识别的表位)和B7-H3-2Ig的至少两个表位(即,被SG27和GB8识别的表位及被BRCA68D和BRCA69D识别的表位)。

[0548]

表 20
通过 ELISA 对 B7-H3mAb 的交叉阻碍分析的概括

竞争性抗体	抗体 (相对于 MIgG 的结合百分比)							
	B7-H34Ig					B7-H3-2Ig		
	GB8	BRCA 69D	BRCA 68D	TES7	OVCA 22	GB8	BRCA 69D	BRCA 68D
GB8	50.211	119.105	108.948	87.480	98.142	26.618	84.408	94.710
TES7	111.234	109.390	108.425	1.605	16.268	100.645	90.734	99.515
OVCA22	121.783	112.322	100.813	3.371	2.048	100.423	87.991	102.766
TDH6	105.591	105.065	100.494	99.839	96.701	100.089	66.086	100.728
SG27	101.266	103.021	97.763	78.331	87.789	64.421	89.927	94.225
BRCA68D	105.934	40.284	43.144	4.815	102.655	98.888	7.635	7.425
BRCA69D	102.558	66.291	71.441	4.334	96.928	94.952	17.346	17.059
MIgG	100.000	100.000	100.00	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

[0549] 表21中示出了本发明的关键抗B7-H3抗体的特性。基于其所显示出的对正常组织和癌组织的差异染色，其结合B7-H3-4Ig以及B7-H3-2Ig的能力、其通过上述BIACORE™分析测量的结合亲和力，及其结合食蟹猕猴B7H3的能力，判断抗体BRCA68D、BRCA69D、BRCA84D和PRCA157是最优选的抗体。

[0550]

表 21

MAb	BRCA 84D	TDH 6	TES7	BRCA 68D	BRCA 69D	GB8	SG 27	OVCA 22	PRCA 157
同种型	G1/k	G1/k	G1/k	G1/k	G1/k	G1/k	2b/k	G1/k	G1/k
IHC	2a	2a	2a	2b	2b	2b	2b	2c	2c
ATCC 阵列	2	1	1	3	3	3	1	3	2
正常组织									
结肠	1+	1+			1+		1+	2+	2+
肺	1+	1+		1+					
肝	1+	1+		2+	2+		1+	2+	2+
肾		1+		1+	1+		1+		
胰		1+		1+			1+	2+	
皮肤									2+
癌性组织									
结肠	1231*	1110*	1.5	2321*	2231*		1221*	1122	2231*
肺	1130	1010	1.75	3332	3231		1120	3131**	3231
前列腺	112	111	3	333	333		222	222	333
乳房	1111	1011	3	3333	3333		1122	3233	2333
内化	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U-DART™	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0551]

表 21

MAb	BRCA 84D	TDH 6	TES7	BRCA 68D	BRCA 69D	GB8	SG 27	OVCA 22	PRCA 157
特异性	4Ig 2Ig	4Ig 2Ig	4Ig	4Ig 2Ig	4Ig 2Ig	4Ig 2Ig	4Ig 2Ig	4Ig	4Ig 2Ig
表位组	A	B	C	D	D	E	F	G	H
BIACORE™	+	+/-	+	++	++	+	+	+	+/-
食蟹猕猴 B7-H3 结合	++	+	-	++	++	++	+	+	++
注释：*表示基质染色 ** 基质染色 3+									

[0552] 实施例10

[0553] 人源化的抗B7-H3抗体

[0554] 将单克隆抗体BRCA84D人源化以产生提供提高的人治疗潜力的抗体(本文总体地指定为“hBRCA84D”)。以下提供了所得人源化抗体(本文指定为“hBRCA84D-1”)的可变轻链和可变重链的序列,及其各自的氨基酸和多核苷酸序列：

[0555] 人源化BRCA84D-1的可变轻链(SEQ ID NO:68)：

[0556]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

[0557] 编码人源化BRCA84D-1的可变轻链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:69)：

[0558]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

[0559] 人源化BRCA84D-1的可变轻链的CDR_1(SEQ ID NO:70)：KASQNVDTNVA

[0560] 编码人源化BRCA84D-1的可变轻链的CDR_1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:71)：aaggccagtc agaatgtgga tactaatgta gcc

[0561] 人源化BRCA84D-1的可变轻链的CDR_2(SEQ ID NO:72)：SASYRYS

[0562] 编码人源化BRCA84D-1的可变轻链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:73)：tcggcatcct accggtacag t

[0563] 人源化BRCA84D-1的可变轻链的CDR_3(SEQ ID NO:74)：QQYNNYPFT

[0564] 编码人源化BRCA84D-1的可变轻链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:75)：cagcaatata acaactatcc attcacg

[0565] 人源化BRCA84D-1的可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:80)：

[0566]

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARGR ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

[0567] 编码人源化BRCA84D-1的可变重链的多核苷酸序列(SEQ ID NO:81)：

[0568]

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg tcctct

[0569] 人源化BRCA84D-1的可变重链的CDR_1(SEQ ID NO:82)：FGMH

[0570] 编码人源化BRCA84D-1的可变重链的CDR1的多核苷酸序列(SEQ ID NO:83)：tttggaatgcac

[0571] 人源化BRCA84D-1的可变重链的CDR_2(SEQ ID NO:84)：YISSDSSAIYYADTVK

[0572] 编码人源化BRCA84D-1的可变重链的CDR_2的多核苷酸序列(SEQ ID NO:85)：tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

[0573] 人源化BRCA84D-1的可变重链的CDR_3(SEQ ID NO:86)：GRENIYYGSRLDY

[0574] 编码人源化BRCA84D-1的可变重链的CDR_3的多核苷酸序列(SEQ ID NO:87)：gggagggaaa acatttacta cggtagtagg cttgactac

[0575] 图11A-11B示出了BRCA84D和其人源化衍生物hBRCA84D的可变轻链(图11A)或可变重链(图11B)的氨基酸残基的比对。

[0576] 为了获得对人的B7-H3显示出提高的亲和力的hBRCA84D种类，对编码hBRCA84D-1的轻链或重链(即，分别是hBRCA84D-1VL或hBRCA84D-1VH)的多核苷酸进行了诱变，并分离和表征了突变的hBRCA84D-1轻链衍生物hBRCA84D-2VL、hBRCA84D-3VL、hBRCA84D-4VL、hBRCA84D-5VL和hBRCA84D-6VL及突变的hBRCA84D-1重链衍生物hBRCA84D-2VH、hBRCA84D-3VH和hBRCA84D-4VH。以下呈现了这些抗体的可变轻链和重链的氨基酸和多核苷酸序列：

[0577] hBRCA84D-2VL(SEQ ID NO:89)：

[0578]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ GTKLEIK

[0579] 编码hBRCA84D-2VL的多核苷酸(SEQ ID NO:90)：

[0580]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

[0581] hBRCA84D-3VL(SEQ ID NO:91)：

[0582]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

[0583] 编码hBRCA84D-3VL的多核苷酸(SEQ ID NO:92)：

[0584]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgtcc gtcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

[0585] hBRCA84D-4VL(SEQ ID NO:93)：

[0586]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GQAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

[0587] 编码hBRCA84D-4VL的多核苷酸(SEQ ID NO:94)：

[0588]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggccaggccc ctaagctgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

[0589] hBRCA84D-5VL(SEQ ID NO:95)：

[0590]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GQAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

[0591] 编码hBRCA84D-5VL的多核苷酸(SEQ ID NO:96)：

[0592]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggccaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

[0593] hBRCA84D-6VL(SEQ ID NO:97)：

[0594]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

[0595] 编码hBRCA84D-6VL的多核苷酸(SEQ ID NO:98)：

[0596]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccgagtacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

[0597] hBRCA84D-2VH(SEQ ID NO:99)：

[0598]

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

[0599] 编码hBRCA84D-2VH的多核苷酸(SEQ ID NO:100)：

[0600]

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgg cagaggccgc
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac
cgtgaccgtg tcctct

[0601] hBRCA84D-3VH(SEQ ID NO:101)：

[0602]

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAMYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

[0603] 编码hBRCA84D-3VH的多核苷酸(SEQ ID NO:102)：

[0604]

```
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
actccctgcg ggacgaggac accgccatgt actactgcgg cagaggccgg
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac
cgtgaccgtg tcctct
```

[0605] hBRCA84D-4VH(SEQ ID NO:103)：

[0606]

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRSED TAVYYCARGR
ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS
```

[0607] 编码hBRCA84D-4VH的多核苷酸(SEQ ID NO:104)：

[0608]

```
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
actccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac
cgtgaccgtg tcctct
```

[0609] 表22列出了所研究的hBRCA84D的可变轻链和可变重链的突变;数字表示图11A和11B中使用的Kabat编号系统。

[0610]

表 22

可变轻链						可变重链			
Kabat 位置	20	21	42	46	85	Kabat 位置	84	89	93
BRCA84D	S	V	Q	A	E	BRCA84D	S	M	G
hBRCA84D-1VL	T	I	K	L	T	hBRCA84D-1VH	D	V	A
hBRCA84D-2VL	T	I	K	A	T	hBRCA84D-2VH	D	V	G
hBRCA84D-3VL	S	V	K	L	T	hBRCA84D-3VH	D	M	G
hBRCA84D-4VL	T	I	Q	L	T	hBRCA84D-4VH	S	V	A
hBRCA84D-5VL	T	I	Q	A	T				
hBRCA84D-6VL	T	I	K	L	E				

[0611] hBRCA84D轻链衍生物hBRCA84D-3VL、hBRCA84D-4VL和hBRCA84D-5VL对人B7-H3的相对结合亲和力通过形成包含这些轻链可变区和嵌合的BRCA84D-1VH重链的抗体测定(图12)。发现对于所测试的hBRCA84D-VL,BRCA84D-5VL(K42Q、L46A)具有最高的结合亲和力。因

此使用BRCA84D-5VL作为轻链来研究hBRCA84D重链，即hBRCA84D-1VH、hBRCA84D-2VH、hBRCA84D-3VH和hBRCA84D-4VH对人B7-H3的相对结合亲和力(图13)。发现对于所测试的hBRCA84D-VH，hBRCA84D-2VH(A93G)具有最高的结合亲和力。

[0612] 嵌合的BRCA84D-1的氨基酸和编码多核苷酸序列如下：

[0613] chBRCA84D轻链(SEQ ID NO:105)：

[0614]

DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKP GQSPKALIYS
ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTINNVQS EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGS
GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

[0615] 编码chBRCA84D轻链的多核苷酸(SEQ ID NO:106)：

[0616]

gacattgcga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga
cagggtcagc gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag
cctggtatca acagaaacca gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg

[0617]

gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat cgcttcacag gcagtggatc
tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtct gaagacttgg
cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg
gggacaaagt tggaaataaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag

[0618] chBRCA84D重链(SEQ ID NO:107)：

[0619]

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNTLF LQMTSLRSED TAMYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGTTLTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP
PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
GK

[0620] 编码chBRCA84D重链的多核苷酸(SEQ ID NO:108)：

[0621]

```
gatgtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc
ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac
attagtagtg acagtagtgc catctactat gcagacacag tgaagggccg
attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc ctgcaaatga
ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg
gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac
tctcacagtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg
caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc
cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac
tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga
caagagagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt
gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt
ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg
tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga
ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc
cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca
ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt
ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc
atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg
ggtaaatga
```

[0622] 比较了包含：(1)hBRCA84D-2VL和hBRCA84D-2VH的抗体(两个试验)，(2)嵌合的BRCA84D，(3)包含hBRCA84D-5VL和嵌合的BRCA84D-HC的抗体，及(4)包含hBRCA84D-5VL和hBRCA84D-2VH的抗体的相对结合亲和力。图14中示出了结果。

[0623] 实施例11

[0624] 人源化的抗B7-H3抗体抑制异种移植体中的肿瘤生长

[0625] 为了阐释人源化的抗B7-H3抗体体内抑制肿瘤生长的能力，在鼠异种移植体中研究了HT-1197膀胱(urinary bladder)癌细胞和A498肾癌细胞的肿瘤生长。人源化抗体hBRCA84D-2(hBRCA84D-2VL链/hBRCA84D-2VL链)被修饰为包含具有置换L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L的Fc区域。植入癌细胞后7天、14天、21天和28天，对小鼠施用Fc-修饰

的hBRCA84D-2抗体(以1μg/kg,10μg/kg或20μg/kg的剂量)。结果表明所施用的Fc-修饰的hBRCA84D-2抗体的所有剂量能够抑制HT-1197膀胱癌细胞(图15)和A498肾癌细胞(图16)的肿瘤生长。

[0626] 实施例12

[0627] 对B7-H3和T细胞受体特异的双亲和再靶向试剂(DART™)介导强效的再导向T细胞杀伤

[0628] 制备了对B7-H3和T细胞受体("TCR")及自然杀伤2D组(NKG2D)受体特异的双亲和再靶向试剂(DART™)。这些DART™具有将T-细胞定位到(通过使该T-细胞与TCR-结合的DART™的TCR-结合部分结合)或将NK-细胞定位到(通过使该NK细胞与NKG2D-结合的DART™的NKG2D-结合部分结合)癌细胞的位置(通过使癌细胞与DART™的B7-H3结合部分结合)。然后被定位的T-细胞或NK细胞能够在本文称为"再导向"杀伤的过程中介导癌细胞的杀伤。

[0629] 对B7-H3和T细胞受体("TCR")特异的双亲和再靶向试剂(DART™)被构建成具有hBRCA84D-2的抗B7-H3可变域和抗TCR可变域:

[0630] TCR VL x hBRCA84D VH-2-E卷曲DART™链(SEQ ID NO:109):

[0631]

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG

TKLEIK**GGGS** **GGGG**EVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSSFGMHW
VRQAPGKGLE WVAYISSDSS AIYYADTVKG RFTISRDNAK NSLYLQMNSL
RDEDTAVYYC GRGRENIYYG SRLDYWGQGT TVTVSS**GGCG** **GG**EVAALEKE
VAALEKEVAA LEKEVAALEK

[0632] 编码TCR VL x hBRCA84D VH-2-E卷曲DART™链的多核苷酸(SEQ ID NO:110):

[0633]

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga
aagagccacc ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact
ggtatcagca gaaaccaggg aaagccccta agcgctggat ctatgacaca
tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg ttcagcggca gtggatctgg
gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa gattttgcaa
cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaa**gg** **aggcggatcc** **ggcggcggag** **gc**gaggtgca
gctggtcgag tctggcggag gactggtgca gcctggcggc tccctgagac
tgtcttgcgc cgcctccggc ttcaccttct ccagcttcgg catgcactgg
gtccgccagg ctccaggcaa gggactggaa tgggtggcct acatctcctc
cgactcctcc gccatctact acgccgacac cgtgaagggc aggttcacca
tctcccggga caacgccaag aactccctgt acctgcagat gaactccctg
cgggacgagg acaccgccgt gtactactgc ggcagaggcc gggagaatat
ctactacggc tcccggctgg attattgggg ccagggcacc accgtgaccg
tgtcctcc**gg** **aggatgtggc** **ggtgga**gaag tggccgcact ggagaaagag
gttgctgctt tggagaagga ggtcgctgca cttgaaaagg aggtcgcagc
cctggagaaa

[0634] hBRCA84DVL-2x TCR VH-K卷曲链(SEQ ID NO:111)：

[0635]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH
WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK GRVTITADKS TSTAYLQMNS
LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSSGGCGG GKVAALKEKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE

[0636] 编码hBRCA84DVL-2x TCR VH-K卷曲链的多核苷酸(SEQ ID NO:112)：

[0637]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga
aggtctcctg caaggccagc ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gatatattaa
tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa ggcagagtca
cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacctgca gatgaacagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta
tgattacgac gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga
gctccggagg atgtggcggt ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt
gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt aaggaaaagg tcgcagccct
gaaagag

[0638] 对B7-H3和自然杀伤2D组(NKG2D)受体特异的双亲和再靶向试剂(DART™)被构建成具有hBRCA84D-2的抗B7-H3可变域和抗TCR可变域：

[0639] NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-E卷曲DART™链(SEQ ID NO:113)：

[0640]

QSALTQPASV SGSPGQSITI SCSGSSSNIG NNAVNWYQQL PGKAPKLLIY
YDDLLPSGVS DRFSGSKSGT SAFLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGPV
FGGGTKLTVL GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF
GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTTVTVSS GGCGGGEVAA
LEKEVAALEKE VAALEKEVA ALEK

[0641] 编码NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-E卷曲DART™链的多核苷酸(SEQ ID NO:114)：

[0642]

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc
aatcaccatc tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg
ttaactggta ccagcagctc ccaggaaagg ctcccaaact cctcatctat
tatgatgacc tactgccctc aggggtctct gaccgattct ctggctccaa
gtctggcacc tcagccttcc tggccatcag tgggctccag tctgaggatg
aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggtccagtg
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta **ggaggcggat ccggcggcgg**
aggcgaggtg cagctggtcg agtctggcgg aggactggtg cagcctggcg
gctccctgag actgtcttgc gccgcctccg gcttcacctt ctccagcttc
ggcatgcact gggtccgcca ggctccaggc aagggactgg aatgggtggc
ctacatctcc tccgactcct ccgccatcta ctacgccgac accgtgaagg
gcaggttcac catctcccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag
atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg
ccgggagaat atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca
ccaccgtgac cgtgtcctcc **ggaggatgtg gcggtgga**ga agtggccgca
ctggagaaag aggttgctgc tttggagaag gaggtcgctg cacttgaaaa
ggaggtcgca gccctggaga aa

[0643] hBRCA84DVL-2x NKG2D VH-K卷曲链(SEQ ID NO:115)：

[0644]

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK**GGG SGGGG**QVQLV ESGGGLVKPG GSLRLSCAAS GFTFSSYGMH
WVRQAPGKGL EWVAFIRYDG SNKYYADSVK GRFTISRDNS KNTLYLQMNS
LRAEDTAVYY CAKDRGLGDG TYFDYWGQGT TVTVSS**GGCG GG**KVAALKEK
VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[0645] 编码hBRCA84DVL-2x NKG2D VH-K卷曲链的多核苷酸(SEQ ID NO:116)：

[0646]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g**ggaggcgga** **tccggcggcg** **gaggc**caggt
acagctggtg gagtctgggg gaggcctggt caagcctgga gggtccctga
gactctcctg tgcagcgtct ggattcacct tcagtagcta tggcatgcac
tgggtccgcc aggctccagg caaggggctg gagtgggtgg catttatacg
gtatgatgga agtaataaat actatgcaga ctccgtgaag ggccgattca
ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc
ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac tgtgcgaaag atcgaggttt
gggggatgga acctactttg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg
tctcctcc**gg** **aggatgtggc** **ggtgga**aaag tggccgcact gaaggagaaa
gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgcagc
cctgaaagag

[0647] 为了阐释DART™介导对癌细胞的这种再导向杀伤的能力，将各种浓度的上述hBRCA84D-2/抗TCR DART™(“T-DART™”)、hBRCA84D-2、hBRCA84D-2(Fc-修饰的:L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L)和TCR-DART™对照与靶癌细胞(SK-MES-1肺癌细胞、A498肾癌细胞、LNCaP前列腺癌细胞或UACC-62黑色素瘤细胞)和效应静息PBMC(E:T比＝30:1)一起孵育并测定细胞毒性(LDH测定)。这些研究的结果示出在图17A-17D中且表明了hBRCA84D-2/抗-TCR DART™(“T-DART™”)介导对癌细胞的再导向杀伤的能力。

[0648] 实施例13

[0649] 无肿瘤小鼠体内的药物动力学特征

[0650] 对雄性mCD16-/-、hCD16A_FOXN1小鼠注射抗B7-H3抗体(Mab1)(5mg/kg;IV)中并在(给药前和)注射后2、15、30min和1、2、4、6hr和1、2、3、6、8、14、21和28天测定血清。发现抗体具有10.54天的$T^1/_2$和43.493μg/ml的C_{max}。发现随时间推移抗体的浓度呈两阶段性，符合二分量模型(two-component model)(图18A-18B)。图18C中示出了使用2室模型以来自5mg/kg剂量的参数产生的预测的药物动力学特征。

[0651] 实施例14

[0652] 抗B7-H3抗体结合HT-1197膀胱癌细胞和在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力

[0653] 评估上述抗B7-H3抗体(Mab1)结合HT-1197(一种表达人B7-H3的膀胱癌细胞系)的能力。如图19中所示，这些细胞显示出比HER2的表达更多的PRCA135表达，且因此特别适合评估本发明的抗体在再介导HT-1197肿瘤中的治疗潜力。根据该结论，发现抗B7-H3抗体hBRCA84D变体能够结合HT-1197细胞。图20示出了Mab1抗体与hHT-1197细胞的结合亲和力。

[0654] 在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下对其植入$8x10^6$HT-1197细胞。

肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内使用0.1、0.5、1、5或10mg/kg的剂量经静脉注射Q7D x5开始用Mab1治疗(每种剂量八只雌性小鼠)。对对照组的小鼠施用1、5或15mg/kg剂量的西妥昔单抗(抗EGRF抗体)(每种剂量八只雌性小鼠)。还对八只雌性小鼠注射介质或10mg/kg的IgG对照。每3-4天进行肿瘤测量。实验结果(图21A)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制膀胱肿瘤的发育。图21B示出了使用西妥昔单抗获得的结果。图21A和21B的对比表明在鼠异种移植模型中阻止或抑制膀胱肿瘤的发育方面,本发明的抗体比西妥昔单抗更有效。图21C对比了在所测试的最大剂量时获得的结果。

[0655] 实施例15

[0656] 抗B7-H3抗体结合HT-1376膀胱癌细胞和在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力

[0657] 评估上述抗B7-H3抗体(Mab1)结合HT-1376(一种表达人B7-H3的膀胱癌细胞系)的能力。如图22A-22B中所示,这些细胞显示出比HER2或PMSA的表达更多的PRCA135表达,且因此特别适合评估本发明的抗体在再介导HT-1376肿瘤中的治疗潜力。根据该结论,发现抗B7-H3抗体hBRCA84D变体能够结合HT-1197细胞。图22A-22B示出了Mab1抗体与hHT-1197细胞的结合亲和力。

[0658] 在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入5x 10^6HT-1376细胞。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内以1mg/kg的剂量经静脉注射Q7D x4开始用Mab1治疗。实验结果(图23)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制膀胱肿瘤的发育。

[0659] 实施例16

[0660] 抗B7-H3抗体结合癌细胞的能力

[0661] 经FACS分析评价了抗B7-H3抗体BRCA84D结合以下细胞的能力:SW480和SW620结肠直肠癌细胞;AGS胃癌细胞;M-14和LOX IMVI黑色素瘤细胞;22rv前列腺癌细胞;AsPC-1和BxPc-3胰腺癌细胞;A498和786-0肾癌细胞。发现该抗体能够结合所有这些细胞。

[0662] 实施例17

[0663] 抗B7-H3抗体在鼠异种移植模型中阻止或抑制胃肿瘤发育的能力

[0664] 在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入5x 10^6AGS细胞。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内使用0.5、1、5或10mg/kg的剂量经静脉注射Q7D x5开始用Mab1治疗。实验结果(图24)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制胃肿瘤发育。

[0665] 实施例18

[0666] 抗B7-H3抗体结合肺癌细胞和在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力

[0667] 在hBRCA84D、chBRCA84D和hBRCA84(0264Fc)变体的存在下孵育A549肺癌细胞并测定这些抗体的细胞毒性效应。该实验的结果示出在图25中,并表明所有三种抗体对A549细胞有细胞毒性。

[0668] 在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入8x 10^6A549细胞。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内使用1mg/kg的剂量经静脉注射Q7D x4开始用Mab1治疗。实验结果(图26)表明Mab1能够在鼠异种移植

模型中阻止或抑制肺癌肿瘤的发育。

[0669] 对CaLu3肺癌细胞进行FACS分析以确定这些细胞是否结合抗B7-H3抗体。实验证实这些细胞表达B7-H3并结合本发明的抗体。为确定本发明的抗体是否有效地阻止或抑制肺癌肿瘤的发育,在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入5x 10^6CaLu3细胞。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内使用0.5、1或5mg/kg的剂量经静脉注射Q7D x4开始用Mab1治疗。实验结果(图27)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制肺癌肿瘤的发育。

[0670] 实施例19

[0671] 抗B7-H3抗体在鼠异种移植模型中阻止或抑制LOX黑色素瘤肿瘤发育的能力

[0672] 在小鼠(八只雌性mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入LOX-IMVI黑色素瘤的癌细胞,并然后经静脉/Q7D x3接种PBS对照、IgG对照(5/mg/kg)、Mab1(0.5、1、5或10mg/kg)或经腹腔/BIWx2接种多西他赛(5、10或20mg/kg)。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内开始用Mab1治疗。实验结果(图28A-28C)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或黑色素瘤癌症肿瘤的发育。

[0673] 实施例20

[0674] 抗B7-H3抗体在鼠异种移植模型中阻止或抑制UACC-62黑色素瘤肿瘤发育的能力

[0675] 在小鼠(八只雌性mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入UACC-62黑色素瘤的癌细胞,并然后经静脉/Q7D x5接种PBS对照、IgG对照(5/mg/kg)、Mab1(0.5、1、5或10mg/kg)。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内开始用Mab1治疗。实验结果(图29)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制黑色素瘤癌症肿瘤的发育。

[0676] 实施例21

[0677] 抗B7-H3抗体在鼠异种移植模型中阻止或抑制22rv前列腺肿瘤发育的能力

[0678] 在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入6x $10^6$22rv前列腺癌细胞,并然后经静脉/Q7D x4接种PBS对照、IgG对照(5/mg/kg)、Mab1(0.5、1、5或10mg/kg;Q7D x5)或曲妥珠单抗(1.7或15mg/kg)。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内开始用Mab1治疗。实验结果(图30A-30C)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或前列腺癌肿瘤的发育。

[0679] 实施例22

[0680] 抗B7-H3抗体结合肾癌细胞和在鼠异种移植模型中阻止或抑制肿瘤发育的能力

[0681] 在hBRCA84D、chBRCA84D和hBRCA84(0264Fc)变体的存在下孵育A498肾癌细胞并测定这些抗体的细胞毒性效应。该实验的结果示出在图31中,并表明所有三种抗体对A498细胞具有细胞毒性。

[0682] 在hBRCA84D、chBRCA84D和hBRCA84(0264Fc)变体的存在下孵育A498肾癌细胞并测定这些抗体的细胞毒性效应。该实验的结果示出在图31中,并表明所有三种抗体对A498细胞具有细胞毒性。

[0683] 使用生物素化的BRCA84D抗体(20μg/ml)、BRCA69D(5μg/ml)和抗-Her2抗体(20μg/ml)进行A498异种移植肿瘤组织的IHC分析。发现BRCA84D抗体结合20-40%的肿瘤组织(弱至中度:+或++);发现BRCA69D抗体结合80-100%的肿瘤组织(中度至强:++或+++)。发现

BRCA84D抗体弱结合40％的UMUC-3肿瘤组织(+)；发现BRCA69D中度或强地结合70％的该肿瘤组织(++或+++)；发现抗Her2抗体不同强度地结合20％的该肿瘤组织(+-+++)。作为对照，发现抗Her2抗体结合SKBR-3细胞(+++)且发现BRCA84D和BRCA69D能够结合Hs 700T细胞(+++)。

[0684] 在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入5x 10^6A498肾癌细胞。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内使用0.1、0.5、1、5或10mg/kg的剂量经静脉Q7D x5开始用Mab1治疗。对对照组的小鼠施用1、7或15mg/kg剂量的西妥昔单抗(抗EGRF抗体)。对另外的对照小鼠注射介质或10mg/kg的IgG对照。实验结果(图32)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制肾癌肿瘤的发育。

[0685] 可选择地，在小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入5x 10^6 786-0肾癌细胞。肿瘤细胞在用MATRIGEL™1:1稀释的200μl的Ham's F12培养基中被植入。在植入的7天内使用0.1、0.5、1、5或10mg/kg的剂量经静脉Q7D x5开始用Mab1治疗。对对照组的小鼠施用1、7或15mg/kg剂量的西妥昔单抗(抗EGRF抗体)。对另外的对照小鼠注射介质或10mg/kg的IgG对照。实验结果(图33A-33B)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制肾癌肿瘤的发育。

[0686] 对Mab1的活性和癌症化疗中使用的紫杉醇(一种有丝分裂抑制剂)的活性进行比较。在数组八只雌性小鼠(mCD16-/-,hCD16A+_FoxN1)的侧腹部经皮下植入786-0肾癌细胞，并然后经静脉Q7D提供0.1、0.5、1、5或10mg/kg剂量的Mab1。在研究日21、28和35对对照组的8只这样的小鼠施用2.5mg/kg剂量的紫杉醇。对另外的对照小鼠(每组七只雌性小鼠)注射介质或5mg/kg的IgG对照。实验结果(图34)表明Mab1能够在鼠异种移植模型中阻止或抑制肾癌肿瘤的发育。

[0687] 实施例23

[0688] 食蟹猕猴的毒理学研究

[0689] 对食蟹猕猴进行毒理学研究以评估Mab1单次用药后的急性毒理学特征，确定Mab1的药物动力学特征，建立用于诱导与效应细胞激活有关的细胞因子的时间对剂量的关系并评估药物治疗对循环的白细胞(例如，NK和T细胞)水平的影响。

[0690] 该研究可被设计成包括四组猴，每组6只猴(3雄性猴和3雌性猴)，并从初始治疗至最后的尸体剖检持续7周。第1组将包含对于第1周和第2周将仅接受介质的对照组。将在第3周处死第1组的四个成员(两只雄性猴和两只雌性猴)。第1组的剩余成员将在第3周接受额外的介质并在第7周被处死用于尸体剖检。第2-4组是将在第1周接受介质并在第2周接受B7-H3抗体(分别是1、30或100mg/kg)的实验组。将在第3周处死每一组的四个成员(两只雄性猴和两只雌性猴)。每一组的剩余成员将在第3周接受额外的介质并在第7周被处死用于尸体剖检。

[0691] 所有的输注是良好耐受的，且未观察到死亡或明显的体重、临床征兆或血清化学的变化。观察到循环的NK细胞剂量依赖性的减少，而未观察到循环的B细胞和T细胞的剂量依赖性的减少。

[0692] 该研究提供了对食蟹猕猴作为相关毒理学物种的验证。当与正常的人组织接触时，抗体BRCA84D在肝、胰、结肠、肺和肾上腺皮质中表现出不同程度的染色强度。肝染色相对地局限于窦衬细胞(成纤维细胞和库弗细胞)。主要在胶原纤维和小百分比上皮(腺泡细

胞或/和闰管细胞)中观察到胰染色。结肠染色相对地局限在腺窝上皮的顶端膜和粘膜成纤维细胞上。肺显示出上皮内的非常弱且呈片状的染色。与人的组织特征相比,除了缺少在肝和胰中的染色和食蟹猕猴垂体细胞中B7-H3的可能表达,BRCA84D在食蟹猕猴组织中表现出良好的交叉反应性。

[0693] 在如同明确并单独地指明每个单独的出版物或专利被通过引用全部并入的相同程度上,本说明书中提及的所有出版物和专利被通过引用并入本文。虽然已结合其具体实施方式描述了本发明,但是应当理解本发明能够具有另外的修改且本申请期望覆盖大体地根据本发明的原理且包括对本公开内容的偏离的本发明的任何变化、用途或改变,所述偏离落在本发明所属领域内已知或惯用做法的范围内且可应用于本文前面提供的主要特征。

序列表

<110> 宏观基因有限公司
德瑞克·卢
菱·黄

<120> 与 B7-H3 反应性的抗体、其免疫学活性片段及其用途

<130> 1301.0071I

<150> US 61/311,057
<151> 2010-03-05

<150> US 61/310,695
<151> 2010-03-04

<150> US 61/310,692
<151> 2010-03-04

<160> 116

[0001] <170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 316
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 1

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140

[0002]

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
165 170 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
180 185 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
225 230 235 240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
245 250 255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260 265 270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275 280 285

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

[0003] <210> 2
<211> 948
<212> DNA
<213> 人类

<400> 2
atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60

ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca 120

ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180

gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240

gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300

gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360

acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct 420

ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480

gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540

gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600

ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc 660

ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag 720

cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt 780

gcactgctgg tggccctggc tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag 840

gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag 900

cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc 948

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> BRCA84D 可变轻链的氨基酸序列

<400> 3

Asp Ile Ala Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA84D 可变轻链的多核苷酸序列

<400> 4
gacattgcga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

[0005]

gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag cctggtatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg 300

gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA84D 可变轻链 CDR1

<400> 5

Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码BRCA84D 可变轻链 CDR1 的多核苷酸序列

<400> 6
aaggccagtc agaatgtgga tactaatgta gcc 33

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA84D 可变轻链 CDR2

[0006]

<400> 7

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA84D 可变轻链 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 8
tcggcatcct accggtacag t 21

<210> 9
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA84D 可变轻链 CDR3

<400> 9

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA84D 可变轻链 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 10
cagcaatata acaactatcc attcacg 27

[0007]

<210> 11
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA84D 可变重链的氨基酸序列

<400> 11

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

[0008]

<210> 12
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA84D 可变重链的多核苷酸序列

<400> 12
gatgtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg acagtagtgc catctactat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg 300

gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360

tcctca 366

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA84D 可变重链 CDR1

<400> 13

Phe Gly Met His
1

<210> 14
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA84D 可变重链 CDR1 的多核苷酸序列

[0009]

<400> 14
tttggaatgc ac 12

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA84D 可变重链 CDR2

<400> 15

Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

<210> 16
<211> 48
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA84D 可变重链 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 16
tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag 48

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA84D 可变重链 CDR3

<400> 17

Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

[0010]

<210> 18
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA84D 可变重链 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 18
gggagggaaa acatttacta cggtagtagg cttgactac 39

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA69D 可变轻链的氨基酸序列

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asp Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

[0011]

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变轻链的多核苷酸序列

<400> 20
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcacgat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattgacaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttcctccgac gttcggtgga 300

ggcaccaaac tggaaatcaa a 321

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA69D 可变轻链 CDR1

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

[0012]

<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变轻链 CDR1 的多核苷酸序列

<400> 22
agggcaagtc aggacattag taattattta aac 33

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA69D 可变轻链 CDR2

<400> 23

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变轻链 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 24
tacacatcac gattacactc a 21

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA69D 可变轻链 CDR3

[0013]

<400> 25

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变轻链 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 26
caacagggta atacgcttcc tccgacg 27

<210> 27
<211> 120
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA69D 可变重链的氨基酸序列

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

[0014]

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变重链的多核苷酸序列

<400> 28
caggttcagc tccagcagtc tggggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaagttg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact agctactgga tgcagtgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattgggact atttatcctg gagatggtga tactaggtac 180

actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca gcagcttggc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagaggg 300

attccacggc tttggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

[0015]
<220>
<223> BRCA69D 可变重链 CDR1

<400> 29

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5

<210> 30
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变重链 CDR1 的多核苷酸序列

<400> 30
agctactgga tgcag 15

<210> 31

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA69D 可变重链 CDR2

<400> 31

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

[0016]

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变重链 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 32
actatttatc ctggagatgg tgatactagg tacactcaga agttcaaggg c 51

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BRCA69D 可变重链 CDR3

<400> 33

Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 34

<210> 33
<211> DNA
<212> 人工序列
<213>

<220>
<223> 编码 BRCA69D 可变重链 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 34
agagggattc cacggctttg gtacttcgat gtc 33

<210> 35
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRCA157 可变轻链的氨基酸序列

<400> 35

[0017]

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
                85                  90                  95
```

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 PRCA157 可变轻链的多核苷酸序列

<400> 36
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60

attacatgtc gagcaagtga gagtatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120

ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat acaaaaacct taccagaggg tgtgccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 240

[0018] gaagattttg ggagatatta ctgtcaacat cattatggta ctcctccgtg gacgttcggt 300

ggaggcacca acctggaaat caaa 324

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRCA157 可变轻链 CDR1

<400> 37

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 38
<211> 33
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 PRCA157 可变轻链 CDR1 的多核苷酸序列

<400> 38
cgagcaagtg agagtattta cagttattta gca 33

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRCA157 可变轻链 CDR2

<400> 39

Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu
1 5

[0019]

<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 PRCA157 可变轻链 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 40
aatacaaaaa ccttaccaga g 21

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRCA157 可变轻链 CDR3

<400> 41

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Trp
1 5

<210> 42
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 PRCA157 可变轻链 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 42
caacatcatt atggtactcc tccgtgg 27

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

[0020] <220>
<223> PRCA157 可变重链的氨基酸序列

<400> 43

Glu Val Gln Gln Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 PRCA157 可变重链的多核苷酸序列

[0021]

<400> 44
gaggtgcagc aggtggagtc gggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt tcctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attaatagtg gtggaagtaa cacctactat 180

ccagacagtt tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacccttac 240

ctgcaaatgc gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgac 300

gggggagcta tggactactg gggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc a 351

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRCA157 可变重链 CDR1

<400> 45

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 46
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 PRCA157 可变重链 CDR1 的多核苷酸序列

<400> 46
tcctatggca tgtct 15

<210> 47
<211> 19
[0022] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRCA157 可变重链 CDR2

<400> 47

Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
1 5 10 15

Leu Lys Gly

<210> 48
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 PRCA157 可变重链 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 48
gtcgcaacca ttaatagtgg tggaagtaac acctactatc cagacagttt gaagggg 57

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRCA157 可变重链 CDR3

<400> 49

His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

[0023]

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 PRCA157 可变重链 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 50
catgacgggg gagctatgga ctac 24

<210> 51
<211> 218
<212> PRT
<213> 人类

<400> 51

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110

[0024]

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 氨基酸接头序列

<400> 52

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

[0025]

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码氨基酸接头序列的多核苷酸

<400> 53
ggaggcggat ccggaggcgg aggc 24

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART C-端氨基酸序列

<400> 54

Leu Gly Gly Cys

1

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 铰链区

<400> 55

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0026]

<220>
<223> 铰链区

<400> 56

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
1 5 10

<210> 57
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART C-端氨基酸序列

<400> 57

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 58
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 DART C-端序列的多核苷酸

<400> 58
gttgagccca aatcttgt 18

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART 的包含半胱氨酸的序列

[0027] <400> 59

Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5 10

<210> 60
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 DART 的 C-端包含半胱氨酸的序列的多核苷酸

<400> 60
ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt 30

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART 的包含半胱氨酸的序列

<400> 61

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 62
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 DART 的包含半胱氨酸的序列的多核苷酸

<400> 62
ttcaacaggg gagagtgt 18

[0028] <210> 63
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART E-卷曲氨基酸序列

<400> 63

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 64
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DART K-卷曲氨基酸序列

<400> 64

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

[0029] <400> 65

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 66
<211> 383
<212> PRT
<213> 人类

<400> 66

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
20 25 30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
35 40 45

Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
50 55 60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
65 70 75 80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu
85 90 95

Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
100 105 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
115 120 125

[0030]

Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
130 135 140

Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
145 150 155 160

Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
165 170 175

Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg
180 185 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met
195 200 205

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
210 215 220

Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg
225 230 235 240

Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val
245 250 255

Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile
260 265 270

Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly
275 280 285

Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln
290 295 300

[0031]

Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile
305 310 315 320

Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
325 330 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
340 345 350

Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
355 360 365

Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
370 375 380

<210> 67
<211> 305

<212> PRT
<213> 人类

<400> 67

```
Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe
            20                  25                  30

Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp
        35                  40                  45

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp
    50                  55                  60
```

[0032]

```
Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys
65                  70                  75                  80

Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu
                85                  90                  95

Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val
        115                 120                 125

Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe
    130                 135                 140

Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln
145                 150                 155                 160
```

Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Leu Pro Pro Met Val Asn Val Ile
165 170 175

Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser
180 185 190

Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val
195 200 205

Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly
210 215 220

Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu
225 230 235 240

Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr
[0033] 245 250 255

His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr
260 265 270

Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
275 280 285

Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
290 295 300

Pro
305

<210> 68
<211> 107
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D-1 可变轻链

<400> 68

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0034]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 69
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变轻链的多核苷酸序列

<400> 69

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D-1 可变轻链 CDR1

[0035] <400> 70

Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变轻链的 CDR1 的多核苷酸序列

<400> 71
aaggccagtc agaatgtgga tactaatgta gcc 33

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D-1 可变轻链 CDR2

<400> 72

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变轻链的 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 73
tcggcatcct accggtacag t 21

[0036]

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D-1 可变轻链 CDR3

<400> 74

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 75
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变轻链的 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 75

cagcaatata acaactatcc attcacg 27

<210> 76

<400> 76
000

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
[0037] 000

<210> 80
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D-1 可变重链的氨基酸序列

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0038]

<210> 81
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变重链的多核苷酸序列

<400> 81
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac 180

gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg 300

gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360

tcctct 366

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D-1 可变重链 CDR1

<400> 82

Phe Gly Met His
1

<210> 83
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变重链 CDR1 的多核苷酸序列

[0039]

<400> 83
tttggaatgc ac 12

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D 可变重链 CDR2

<400> 84

Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

<210> 85
<211> 48
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变重链 CDR2 的多核苷酸序列

<400> 85
tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag 48

<210> 86
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BRCA84D-1 可变重链 CDR3

<400> 86

Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

[0040]

<210> 87
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化的 BRCA84D-1 可变重链 CDR3 的多核苷酸序列

<400> 87
gggagggaaa acatttacta cggtagtagg cttgactac 39

<210> 88

<400> 88
000

<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84D-2VL

<400> 89

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0041] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 90
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84D-2VL 的多核苷酸

<400> 90
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84D-3VL

<400> 91

[0042]

```
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
            20                  25                  30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
                85                  90                  95
```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 92
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84D-3VL 的多核苷酸

<400> 92
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgtcc 60

gtcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

[0043]

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84D-4VL

<400> 93

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

[0044]

<210> 94
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84D-4VL 的多核苷酸

<400> 94
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggccaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84D-5VL

<400> 95

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

[0045]

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 96
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 hBRCA84D-5VL 的多核苷酸

<400> 96

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggccaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

[0046]

<220>
<223> hBRCA84D-6VL

<400> 97

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 98
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84D-6VL 的多核苷酸

<400> 98
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

[0047]

ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccgagtacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 99
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84D-2VH

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0048]

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84D-2VH 的多核苷酸

<400> 100
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac 180

gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgg cagaggccgg 300

gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360

tcctct 366

<210> 101
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84D-3VH

<400> 101

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0049] 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 102
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84D-3VH 的多核苷酸

<400> 102
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120

[0050] ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac 180

gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccatgt actactgcgg cagaggccgg 300

gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360

tcctct 366

<210> 103
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84D-4VH

<400> 103

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0051]

Ala Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84D-4VH 的多核苷酸

<400> 104
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac 180

gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcagatga actccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg 300

gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360

tcctct 366

<210> 105
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> chBRCA84D 轻链

<400> 105

Asp Ile Ala Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
[0052] 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

[0053]

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 106
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 chBRCA84D 轻链的多核苷酸

<400> 106
gacattgcga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag cctggtatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg 300

gggacaaagt tggaaataaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 107
<211> 452
[0054] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> chBRCA84D 重链

<400> 107

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

[0055]

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

[0056]

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 108
<211> 1359
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 chBRCA84D 重链的多核苷酸

<400> 108

[0057]

gatgtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg acagtagtgc catctactat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg 300

gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360

tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccccctgg caccctcctc caagagcacc 420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260

[0058] aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1359

<210> 109
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TCR VL x hBRCA84D VH-2-E 卷曲 DART 链

<400> 109

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

```
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
        35                  40                  45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            100                 105                 110
```

[0059]

```
Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
    130                 135                 140

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
                165                 170                 175

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
            180                 185                 190

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205
```

Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
245 250 255

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

<210> 110
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列

[0060]

<220>
<223> 编码 TCR VL x hBRCA84D VH-2-E 卷曲 DART 链的多核苷酸

<400> 110
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg 120

aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg 180

ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa 240

gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg 300

accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctggtcgag 360

tctggcggag gactggtgca gcctggcggc tccctgagac tgtcttgcgc cgcctccggc 420

ttcaccttct ccagcttcgg catgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa gggactggaa 480

tgggtggcct acatctcctc cgactcctcc gccatctact acgccgacac cgtgaagggc 540

aggttcacca tctcccggga caacgccaag aactccctgt acctgcagat gaactccctg 600

cgggacgagg acaccgccgt gtactactgc ggcagaggcc gggagaatat ctactacggc 660

tcccggctgg attattgggg ccagggcacc accgtgaccg tgtcctccgg aggatgtggc 720

ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag gttgctgctt tggagaagga ggtcgctgca 780

cttgaaaagg aggtcgcagc cctggagaaa 810

<210> 111
<211> 269
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84DVL-2 x TCR VH - K 卷曲链

<400> 111

[0061]

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
165 170 175

[0062]

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
195 200 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 112
<211> 807
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 hBRCA84DVL-2 x TCR VH - K 卷曲链的多核苷酸

<400> 112

[0063]

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacctgca gatgaacagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt 720

ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780

aaggaaaagg tcgcagccct gaaagag 807

<210> 113
<211> 274
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-E 卷曲 DART 链

<400> 113

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

[0064]

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly
210 215 220

Ser Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
245 250 255

[0065]

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
260 265 270

Glu Lys

<210> 114
<211> 822
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-E 卷曲 DART 链的多核苷酸

<400> 114
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc aatcaccatc 60

tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg ttaactggta ccagcagctc 120

ccaggaaagg ctcccaaact cctcatctat tatgatgacc tactgccctc aggggtctct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagccttcc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggtccagtg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggaggcggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360

cagctggtcg agtctggcgg aggactggtg cagcctggcg gctccctgag actgtcttgc 420

gccgcctccg gcttcacctt ctccagcttc ggcatgcact gggtccgcca ggctccaggc 480

aagggactgg aatgggtggc ctacatctcc tccgactcct ccgccatcta ctacgccgac 540

accgtgaagg gcaggttcac catctcccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag 600

atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg ccgggagaat 660

atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgtcctcc 720

[0066] ggaggatgtg gcggtggaga agtggccgca ctggagaaag aggttgctgc tttggagaag 780

gaggtcgctg cacttgaaaa ggaggtcgca gccctggaga aa 822

<210> 115
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH - K 卷曲链

<400> 115

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

[0067] Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130 135 140

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
165 170 175

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
180 185 190

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 116
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列

[0068]

<220>
<223> 编码 hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH - K 卷曲链的多核苷酸

<400> 116
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact acccctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt acagctggtg 360

gagtctgggg gaggcctggt caagcctgga gggtccctga gactctcctg tgcagcgtct 420

ggattcacct tcagtagcta tggcatgcac tgggtccgcc aggctccagg caaggggctg 480

gagtgggtgg catttatacg gtatgatgga agtaataaat actatgcaga ctccgtgaag 540

ggccgattca ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc 600

ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac tgtgcgaaag atcgaggttt gggggatgga 660

acctactttg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctccgg aggatgtggc 720

[0069]

ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca 780

cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag 810

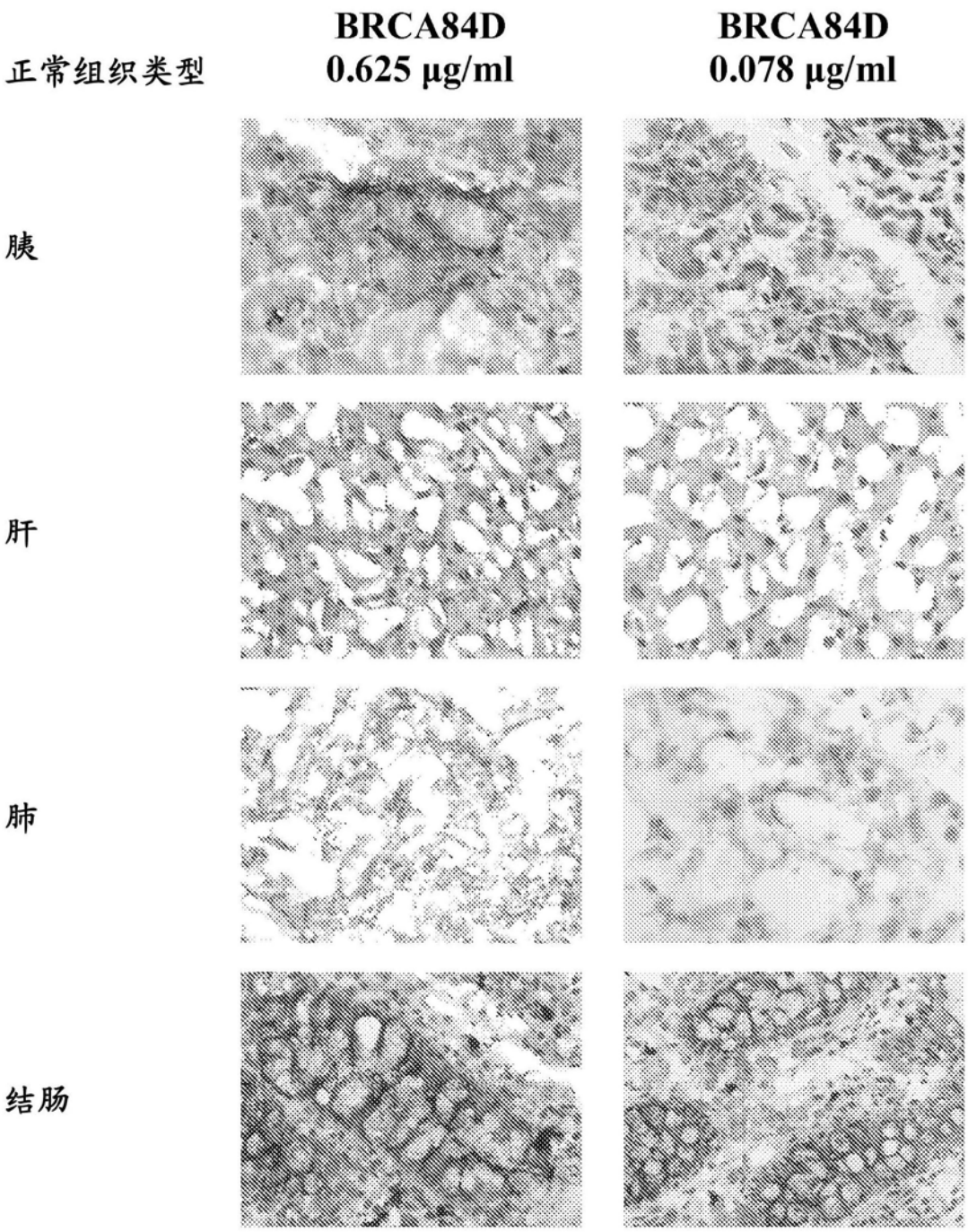


图1A

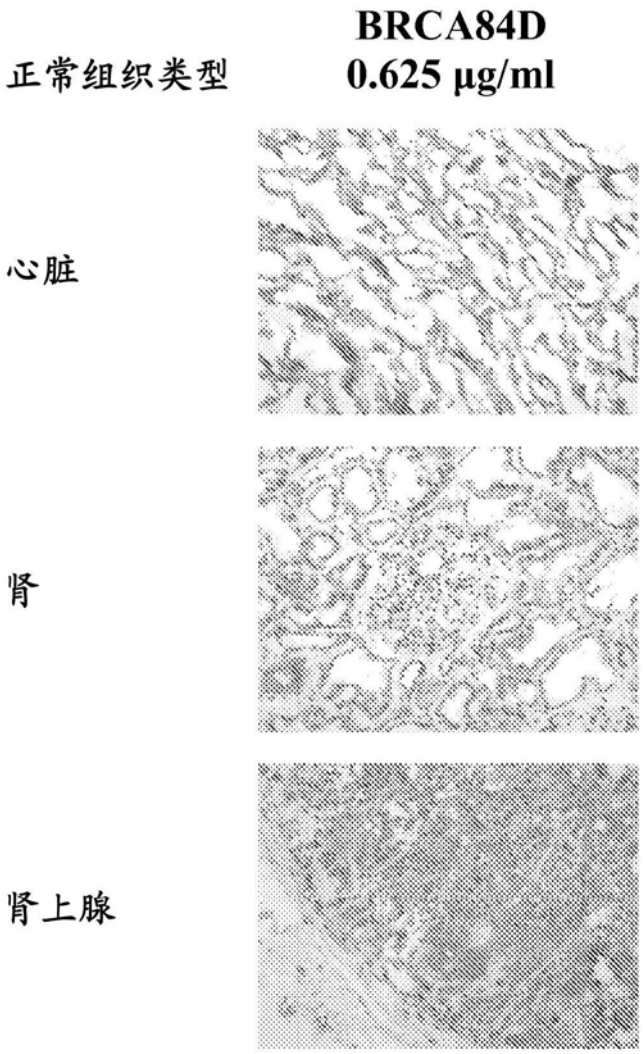


图1B

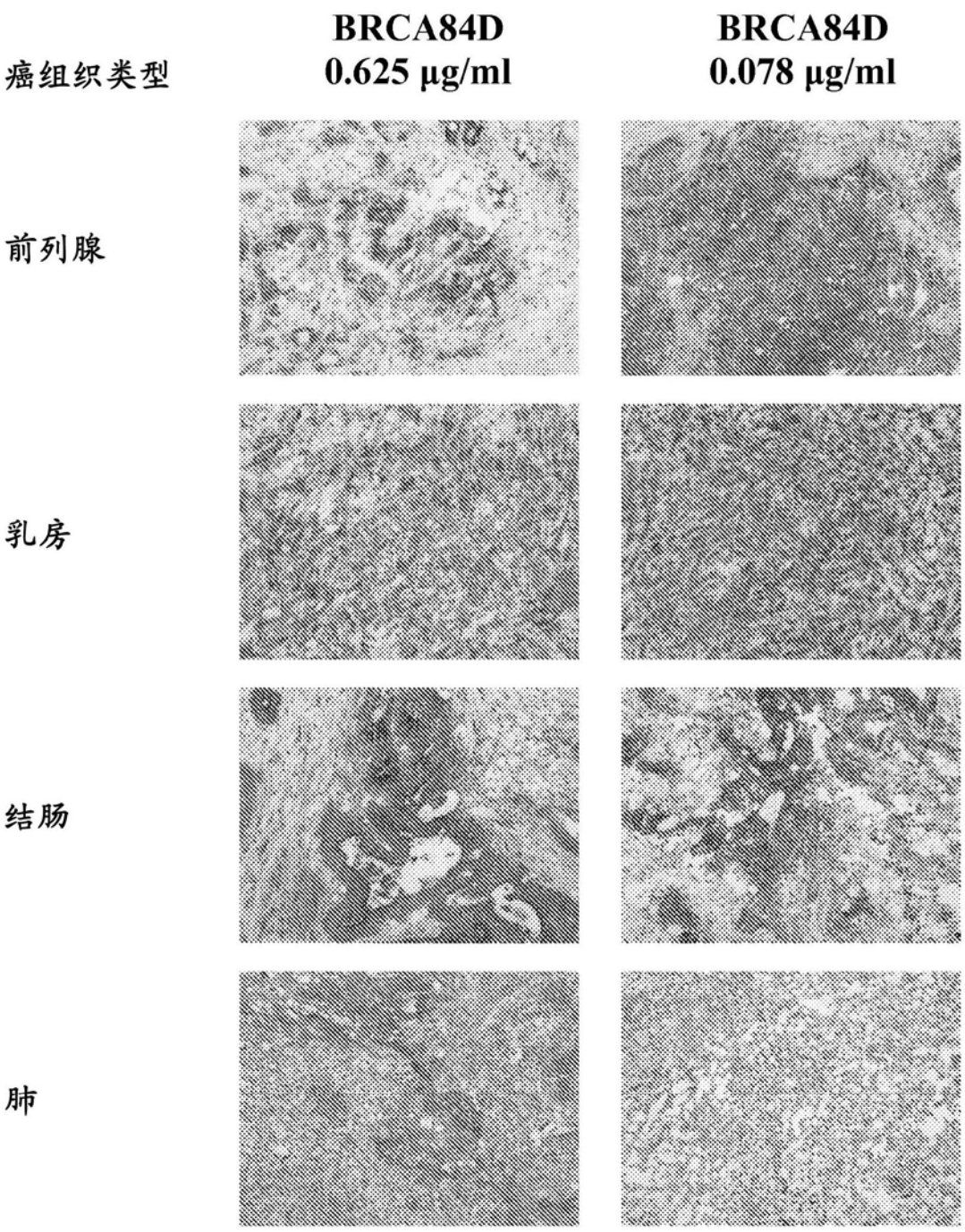


图2

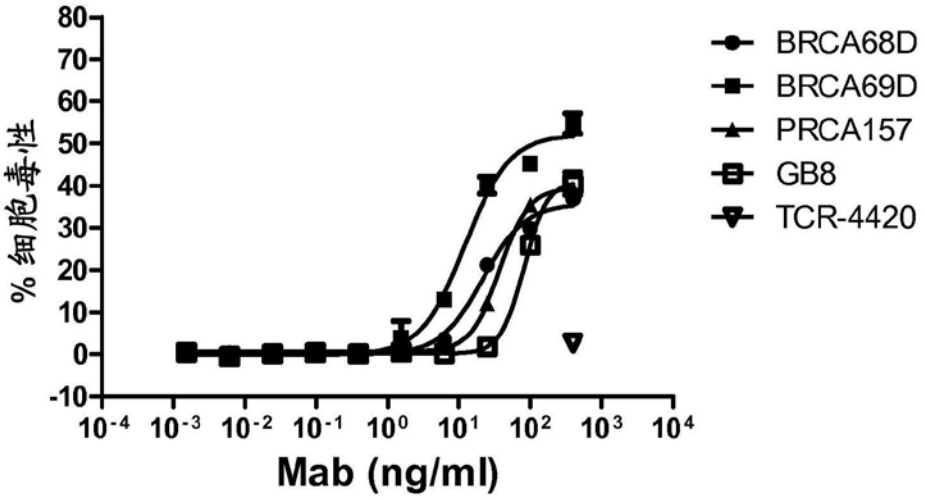

% 细胞毒性
Mab (ng/ml)
BRCA68D
BRCA69D
PRCA157
GB8
TCR-4420

图3A

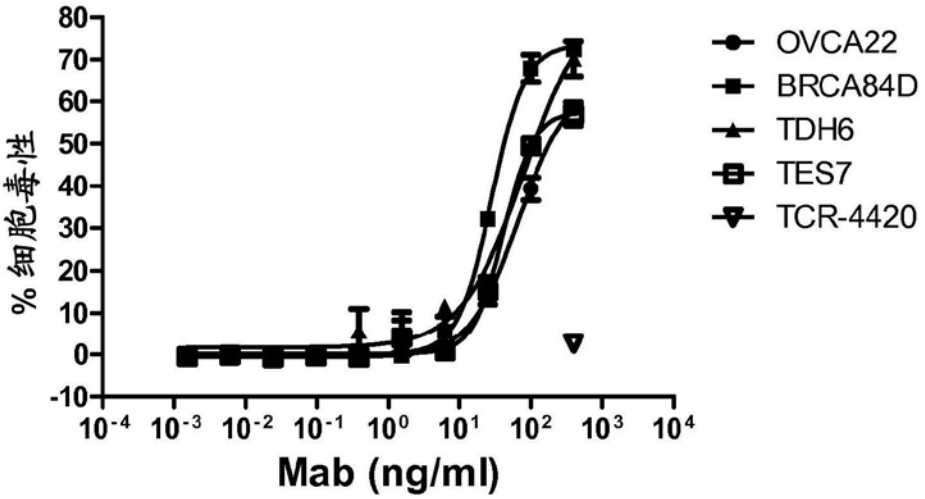

% 细胞毒性
Mab (ng/ml)
OVCA22
BRCA84D
TDH6
TES7
TCR-4420

图3B

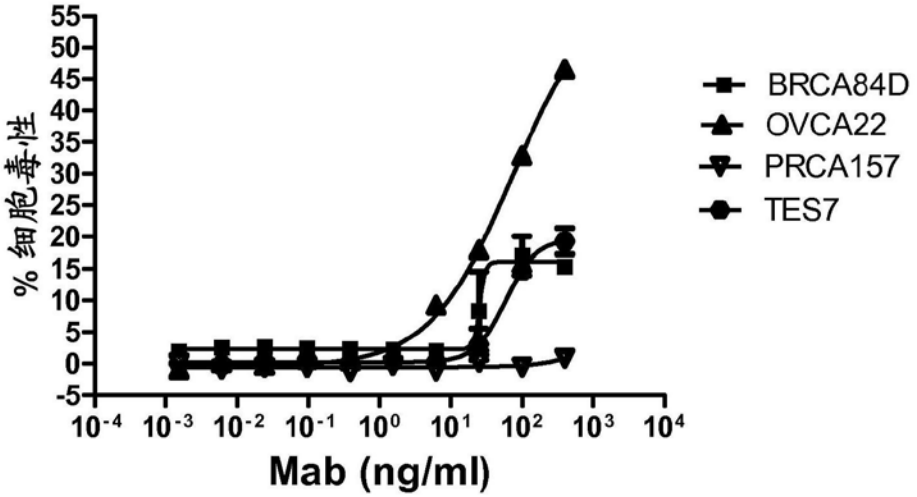

% 细胞毒性
Mab (ng/ml)
BRCA84D
OVCA22
PRCA157
TES7

图3C

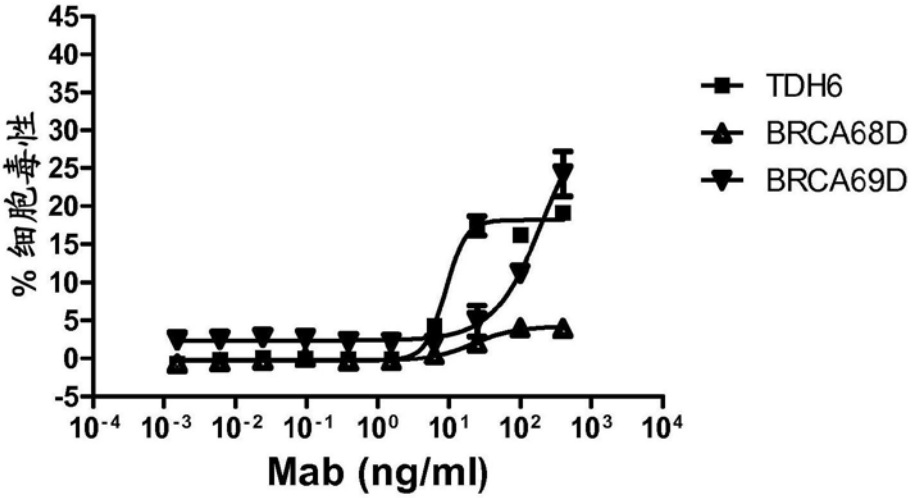

% 细胞毒性
Mab (ng/ml)
TDH6
BRCA68D
BRCA69D

图3D

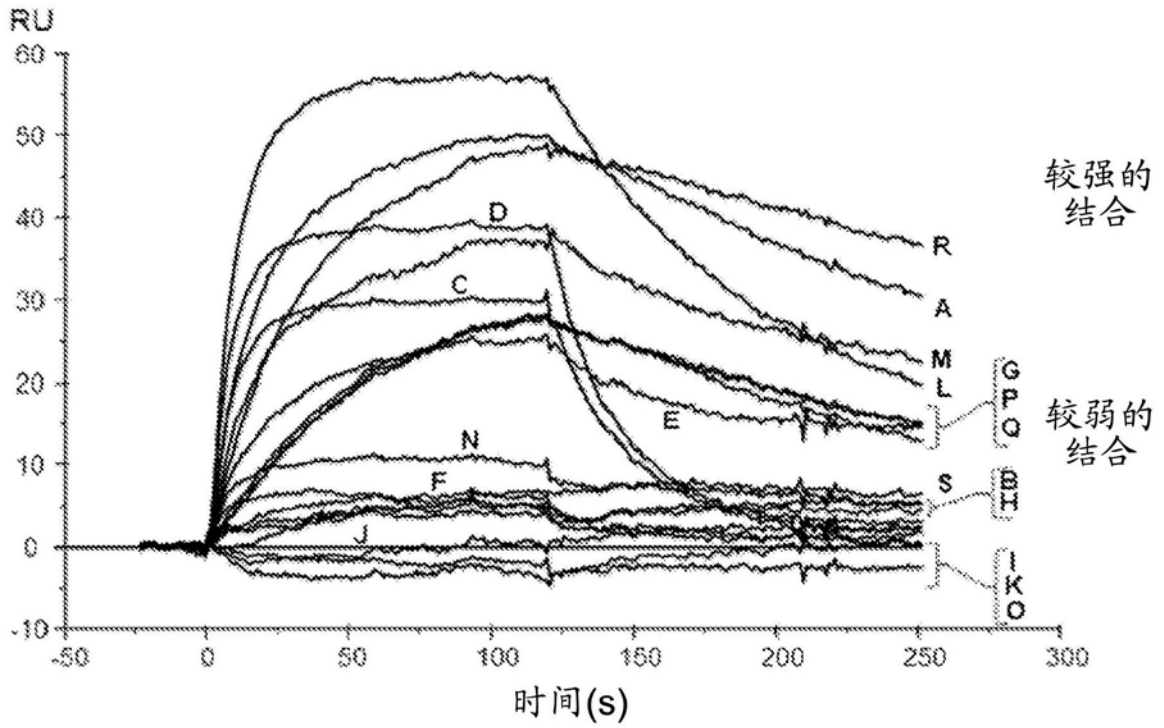

RU
60
50
40
30
20
10
0
-10
-50
0
50
100
150
200
250
300
时间(s)
较强的结合
较弱的结合
D
C
N
F
J
E
R
A
M
L
G
P
Q
S
B
H
I
K
O

图4A

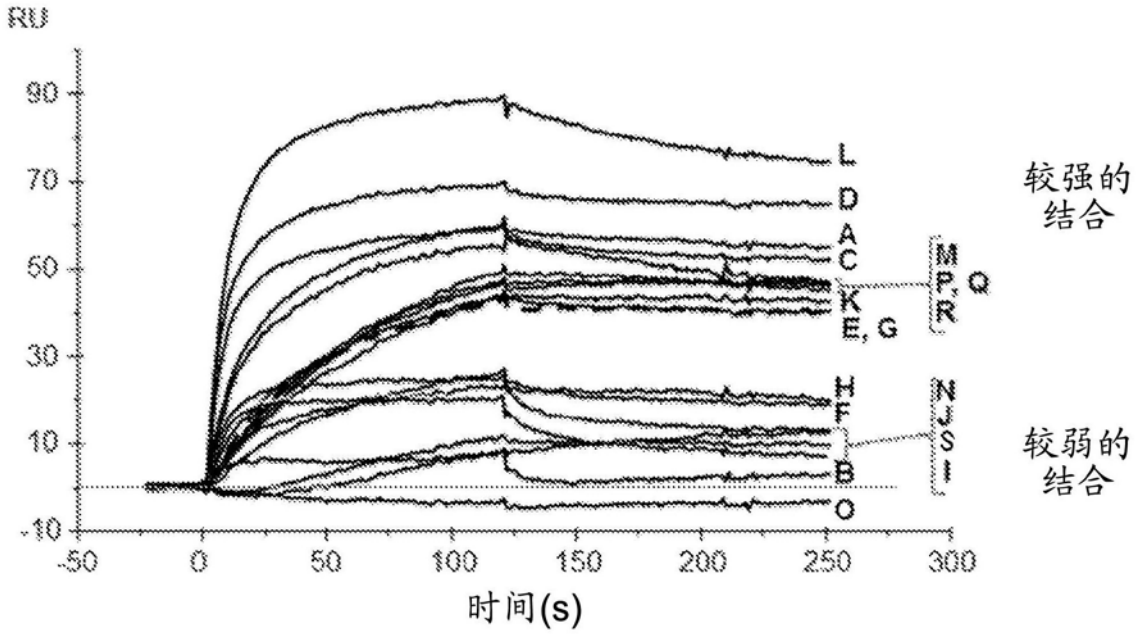

RU
90
70
50
30
10
-10
-50
0
50
100
150
200
250
300
时间(s)
较强的结合
较弱的结合
L
D
A
C
K
E, G
M
P, R
Q
H
F
B
O
N
J
S
I

图4B

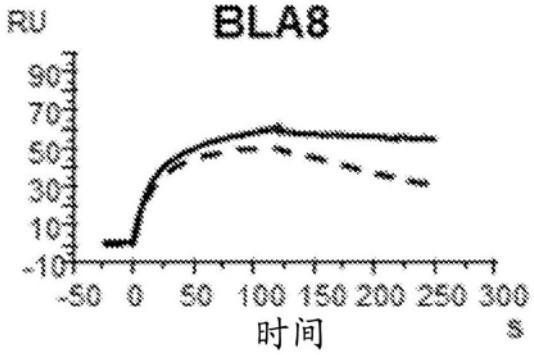

RU
BLA8
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5A

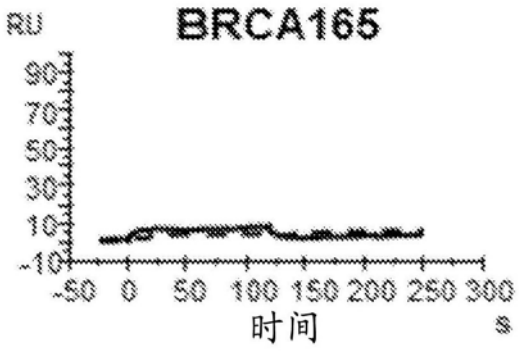

RU
BRCA165
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5B

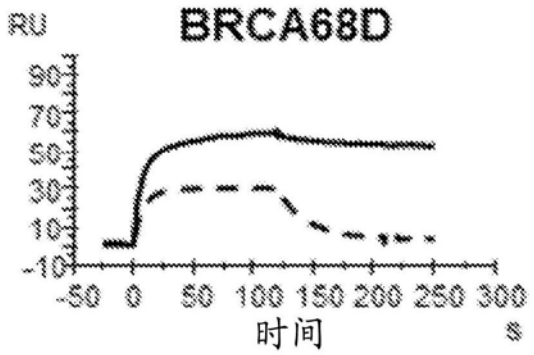

RU
BRCA68D
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5C

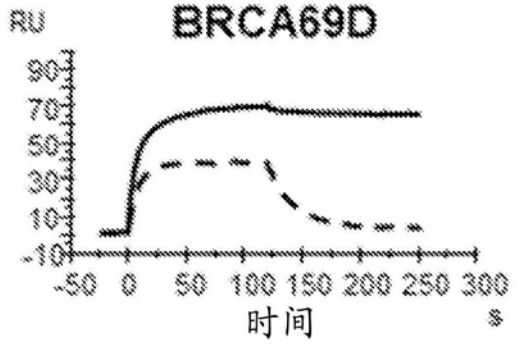

RU
BRCA69D
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5D

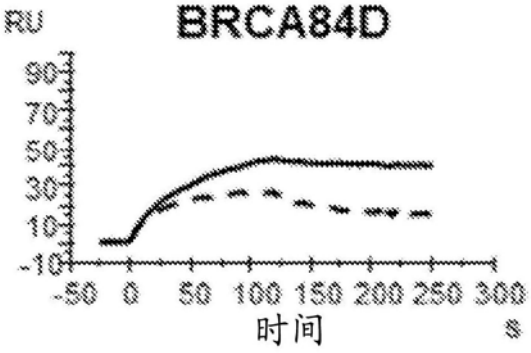

RU
BRCA84D
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5E

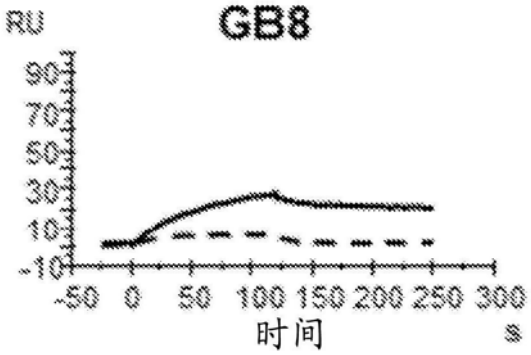

RU
GB8
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5F

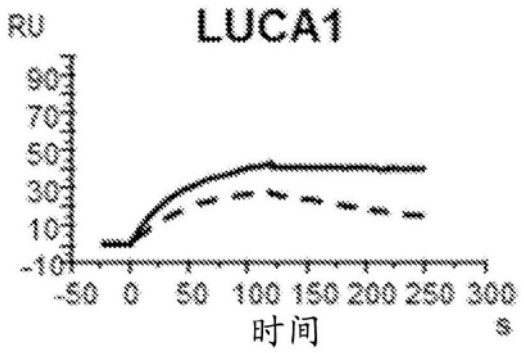

RU
LUCA1
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5G

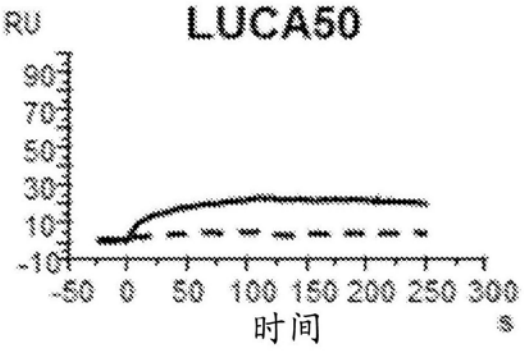

RU
LUCA50
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5H

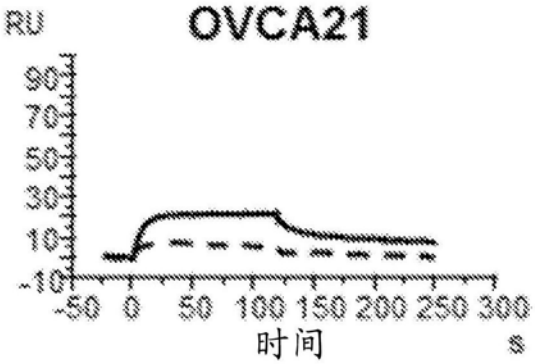

RU
OVCA21
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5I

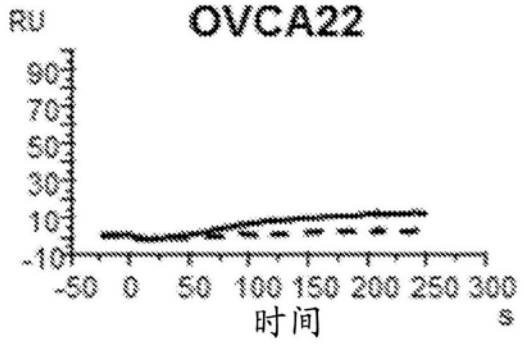

RU
OVCA22
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5J

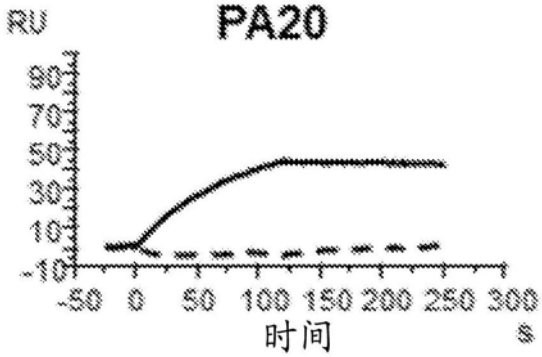

RU
PA20
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5K

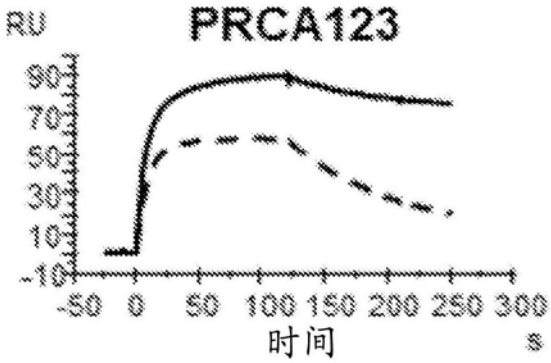

RU
PRCA123
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5L

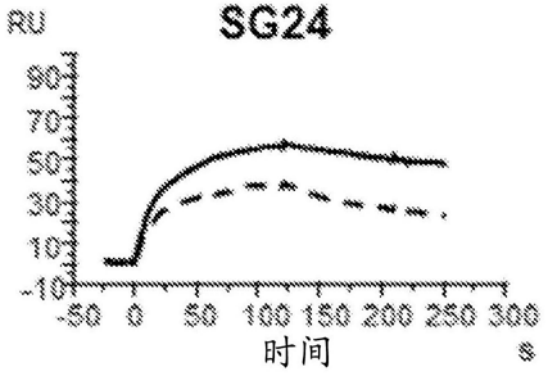

RU
SG24
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5M

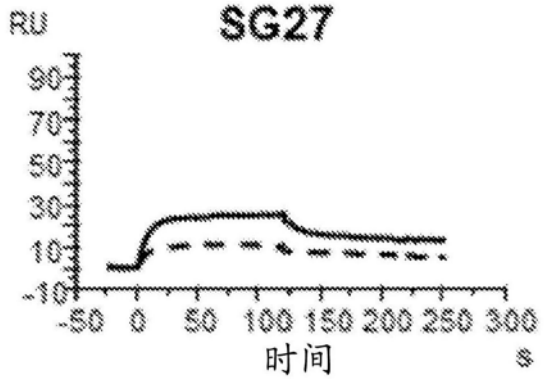

RU
SG27
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5N

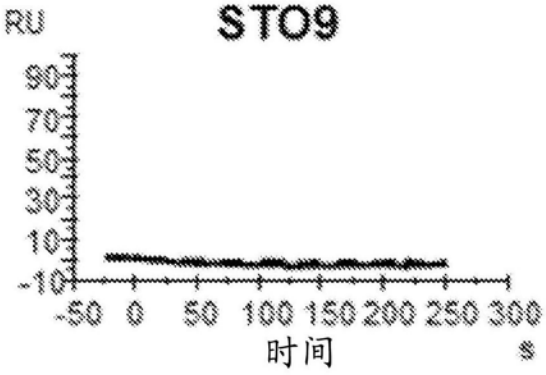

RU
STO9
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5O

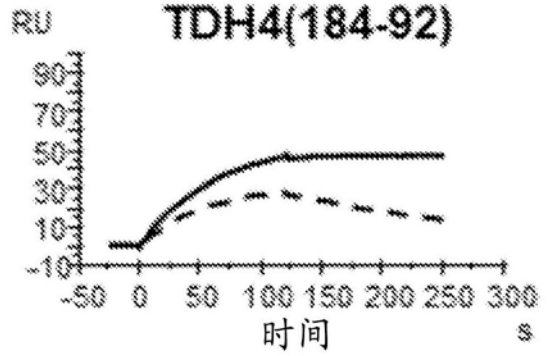

RU
TDH4(184-92)
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5P

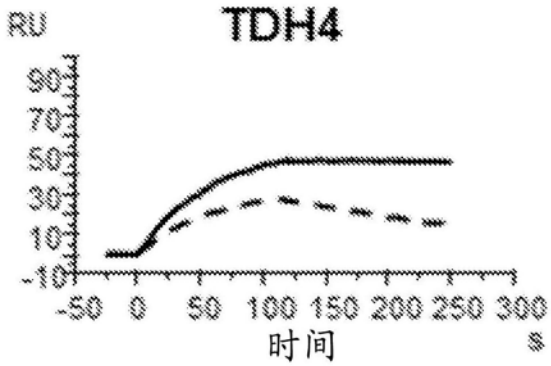

RU
TDH4
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5Q

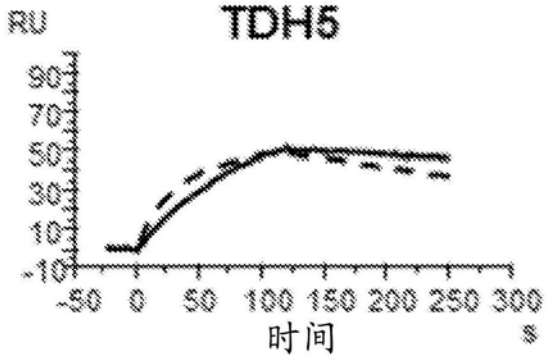

RU
TDH5
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
s

图5R

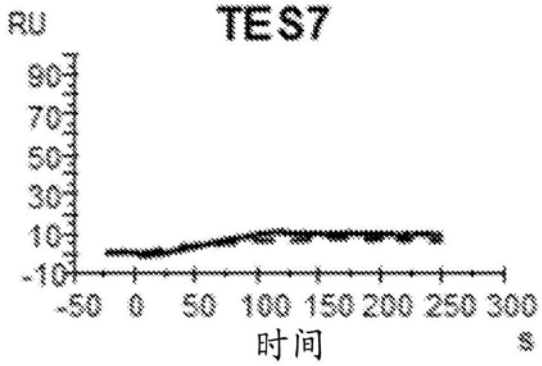

RU
TES7
90
70
50
30
10
-10
-50 0 50 100 150 200 250 300
时间
S

图5S

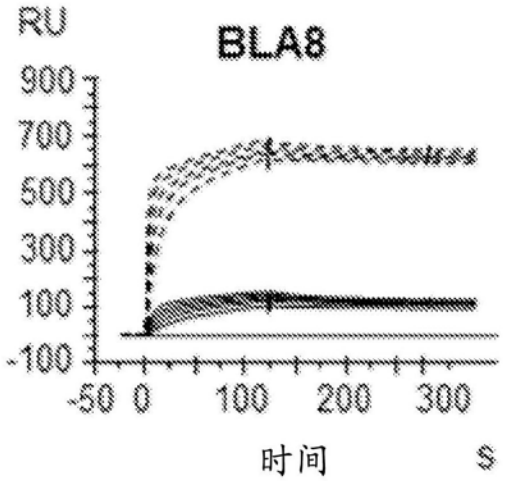

RU
BLA8
900
700
500
300
100
-100
-50 0 100 200 300
时间
S

图6A

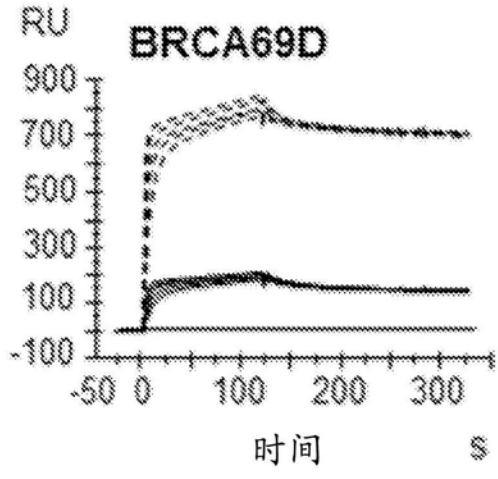

RU
BRCA69D
900
700
500
300
100
-100
-50 0 100 200 300
时间
S

图6B

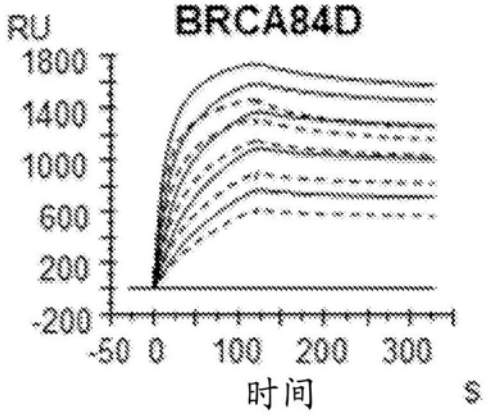

BRCA84D
RU
1800
1400
1000
600
200
-200
-50 0 100 200 300
时间
S

图6C

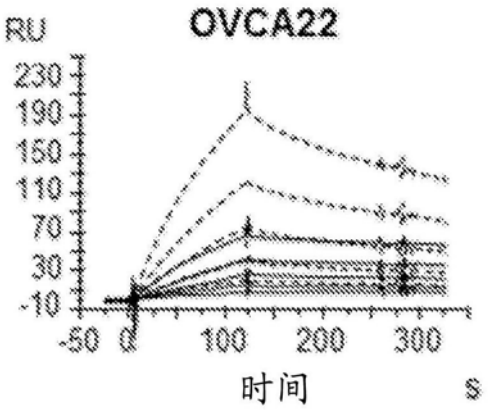

OVCA22
RU
230
190
150
110
70
30
-10
-50 0 100 200 300
时间
S

图6D

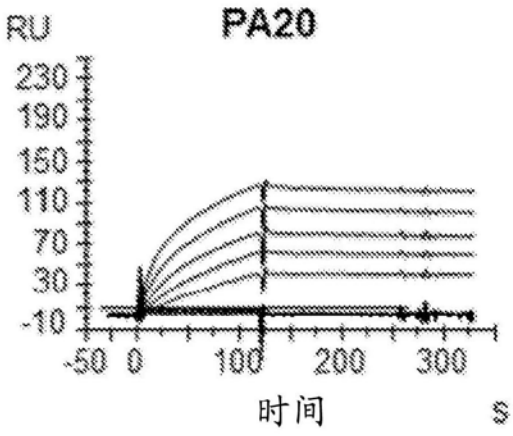

PA20
RU
230
190
150
110
70
30
-10
-50 0 100 200 300
时间
S

图6E

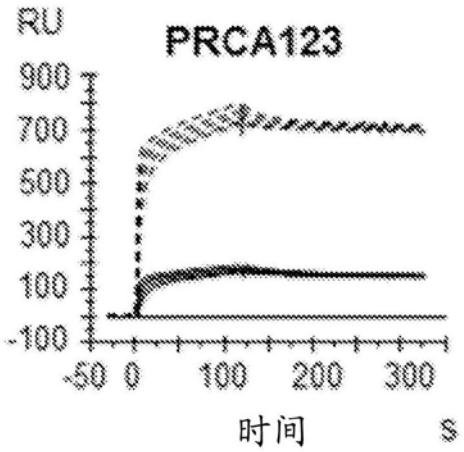

RU
PRCA123
900
700
500
300
100
-100
-50 0 100 200 300
时间 S

图6F

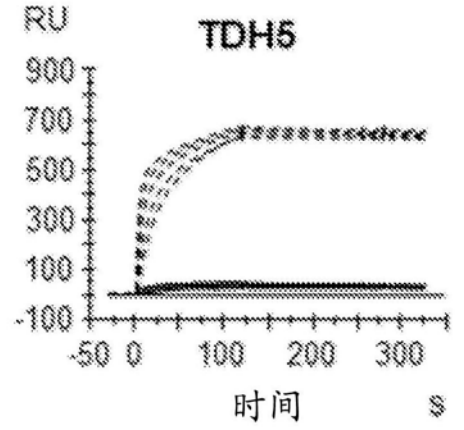

RU
TDH5
900
700
500
300
100
-100
-50 0 100 200 300
时间 S

图6G

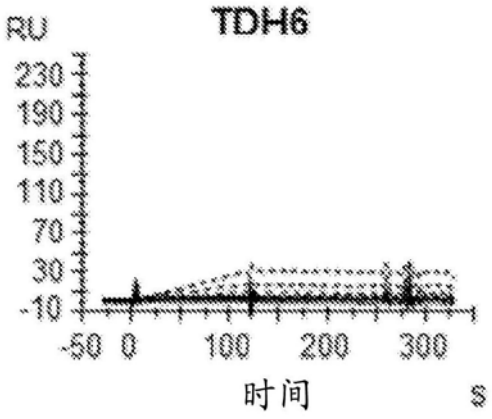

RU
TDH6
230
190
150
110
70
30
-10
-50 0 100 200 300
时间 S

图6H

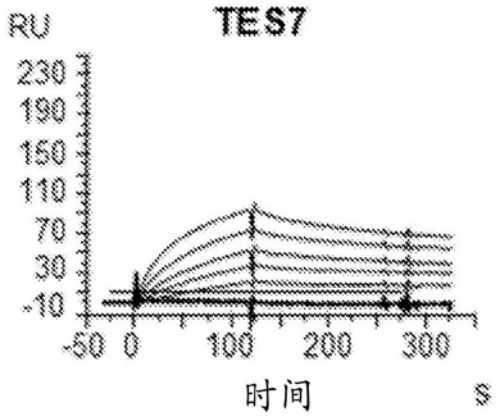

RU
TES7
230
190
150
110
70
30
-10
-50
0
100
200
300
时间
S

图6I

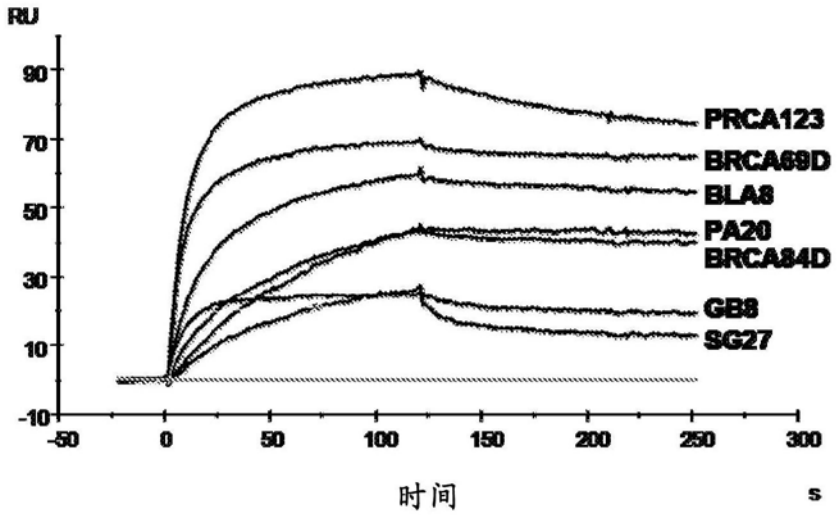

RU
90
70
50
30
10
-10
-50
0
50
100
150
200
250
300
时间
s
PRCA123
BRCA69D
BLA8
PA20
BRCA84D
GB8
SG27

图7

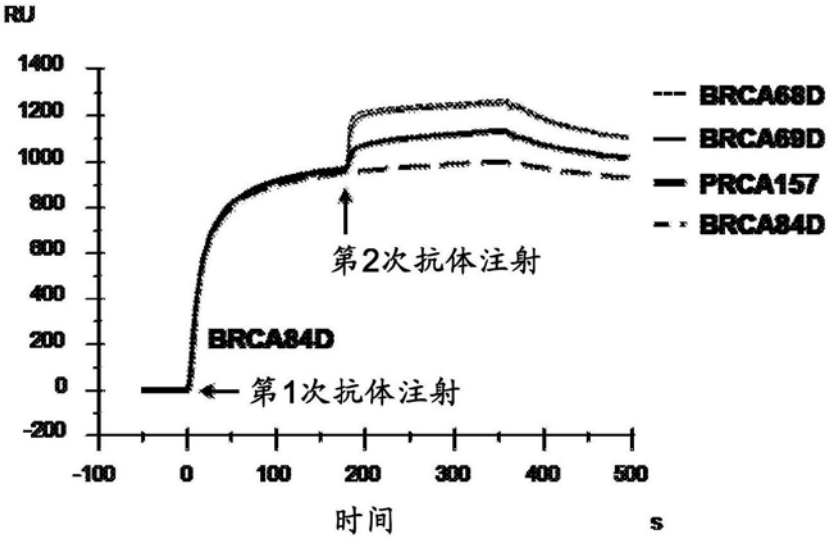

RU
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
-100
0
100
200
300
400
500
时间
s
BRCA68D
BRCA69D
PRCA157
BRCA84D
第2次抗体注射
BRCA84D
第1次抗体注射

图8

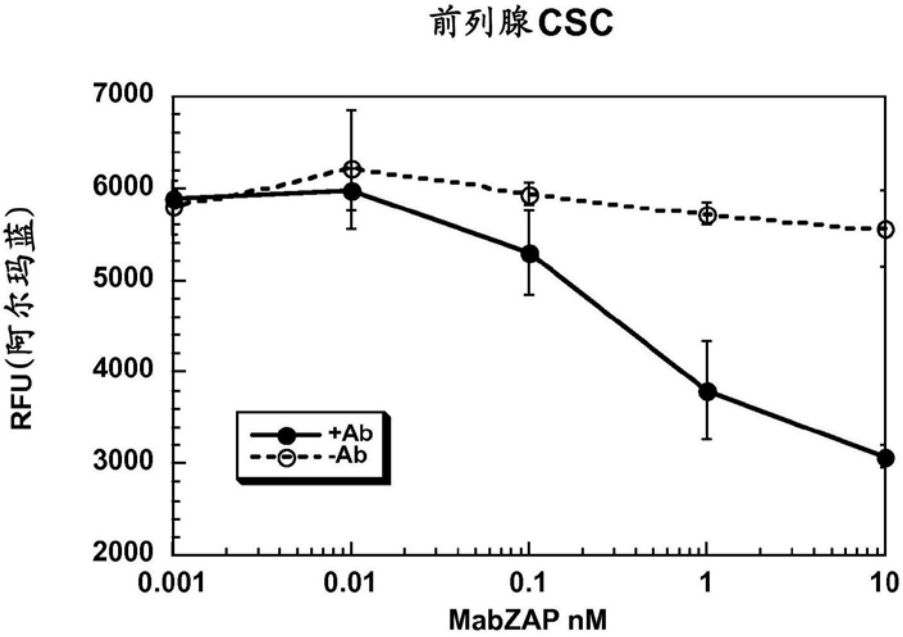

前列腺CSC
RFU(阿尔玛蓝)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
0.001
0.01
0.1
1
10
MabZAP nM
+Ab
-Ab

图9A

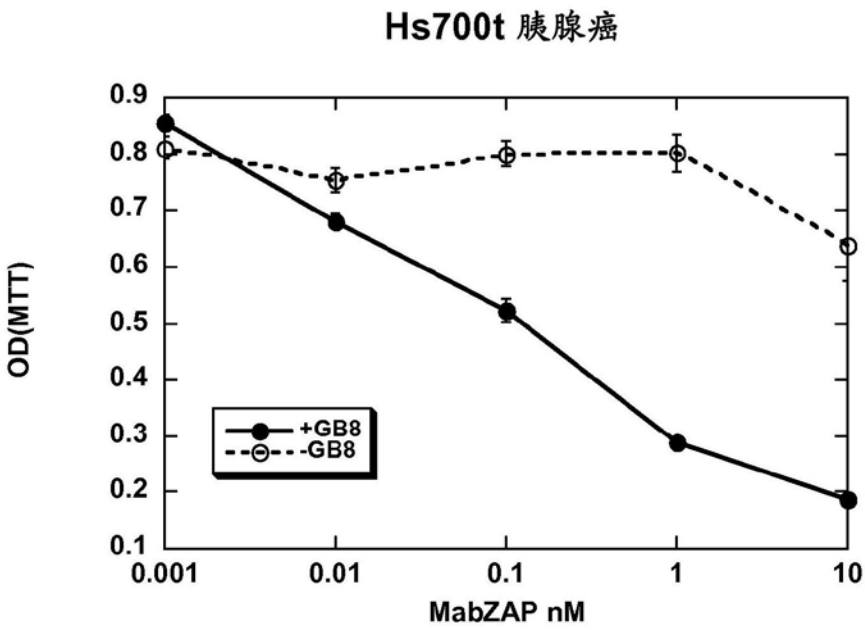

Hs700t 胰腺癌
OD(MTT)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.001
0.01
0.1
1
10
MabZAP nM
+GB8
-GB8

图9B

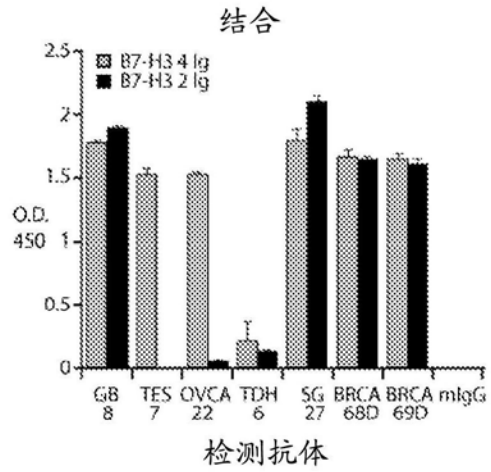

结合
B7-H3 4 Ig
B7-H3 2 Ig
O.D. 450
2.5
2
1.5
1
0.5
0
GB 8
TES 7
OVCA 22
TDH 6
SG 27
BRCA 68D
BRCA 69D
mIgG
检测抗体

图10A

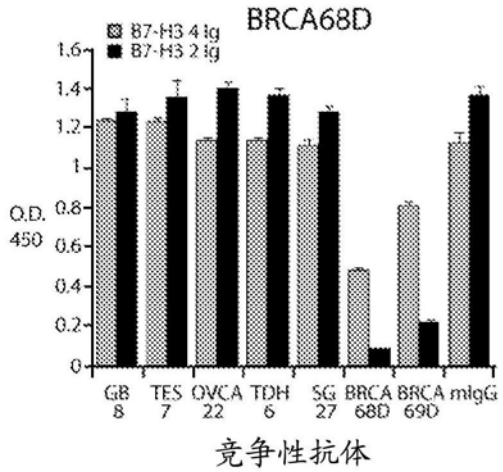


图10B

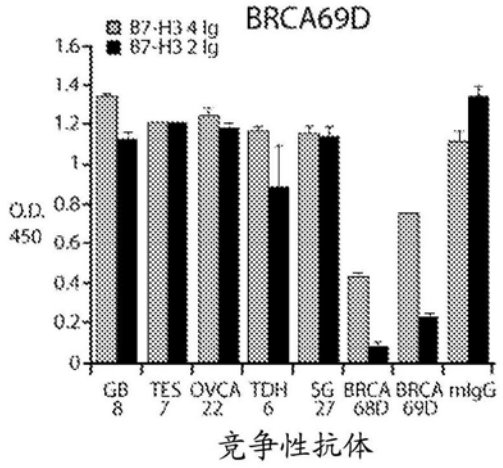


图10C

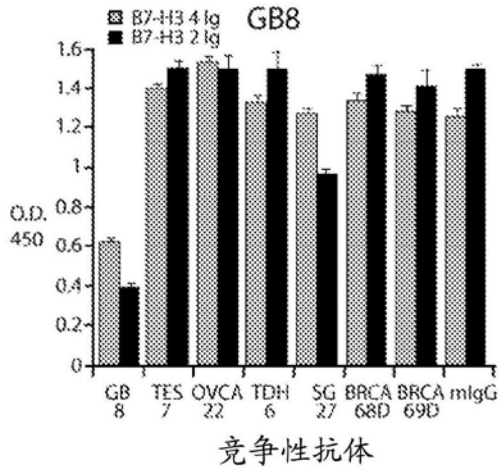


图10D

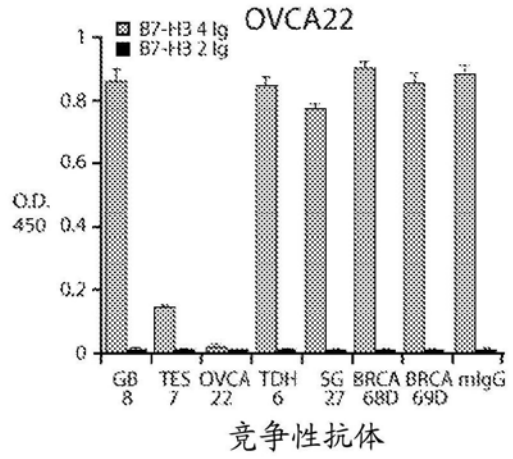

OVCA22
B7-H3 4 Ig
B7-H3 2 Ig
O.D. 450
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
GB 8
TES 7
OVCA 22
TDH 6
SG 27
BRCA 68D
BRCA 69D
mIgG
竞争性抗体

图10E

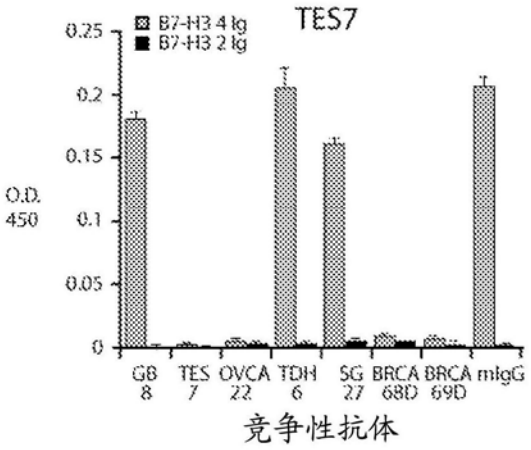
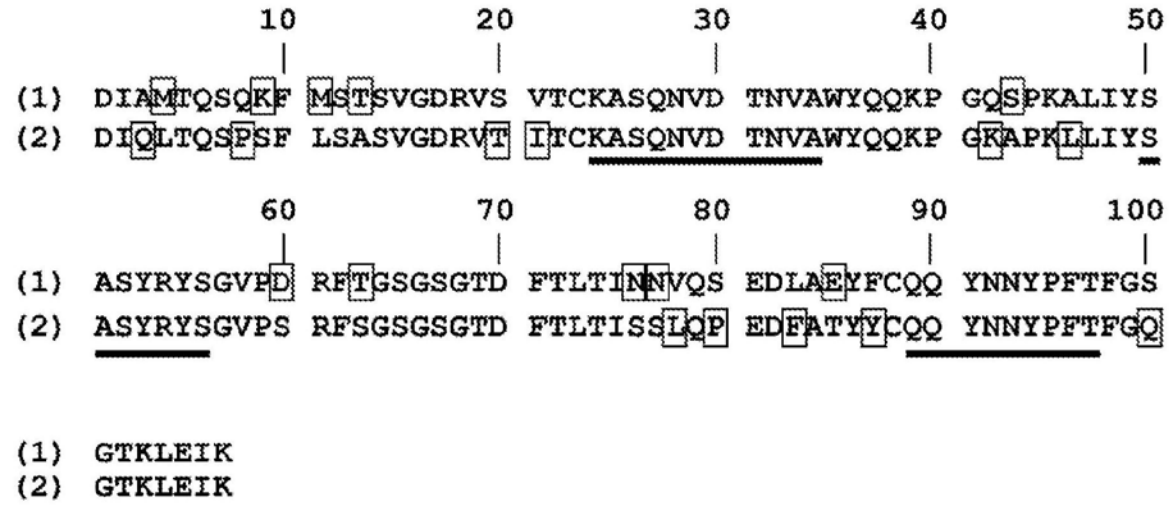
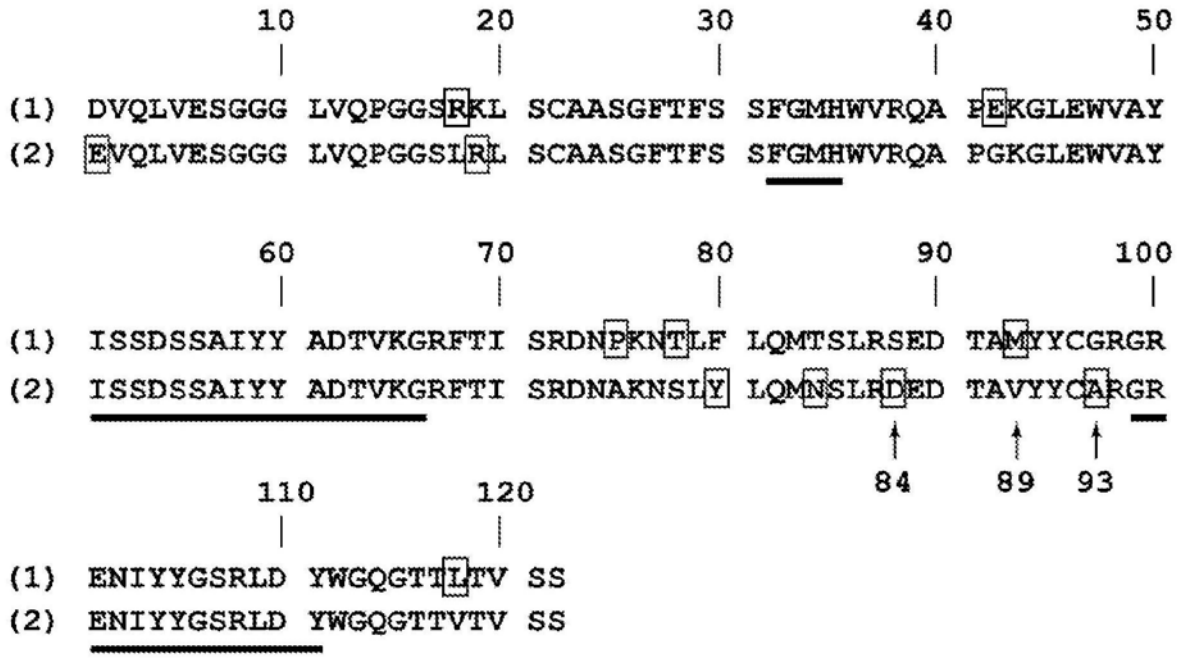

TES7
B7-H3 4 Ig
B7-H3 2 Ig
O.D. 450
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
GB 8
TES 7
OVCA 22
TDH 6
SG 27
BRCA 68D
BRCA 69D
mIgG
竞争性抗体

图10F



(1) BRCA84D 可变轻链 (SEQ ID NO:3)
(2) 人源化BRCA84D-1的可变轻链 (SEQ ID NO:68)

图11A



(1) BRCA84D 可变重链 (SEQ ID NO:11)
(2) 人源化BRCA84D-1的可变重链 (SEQ ID NO:80)

图11B

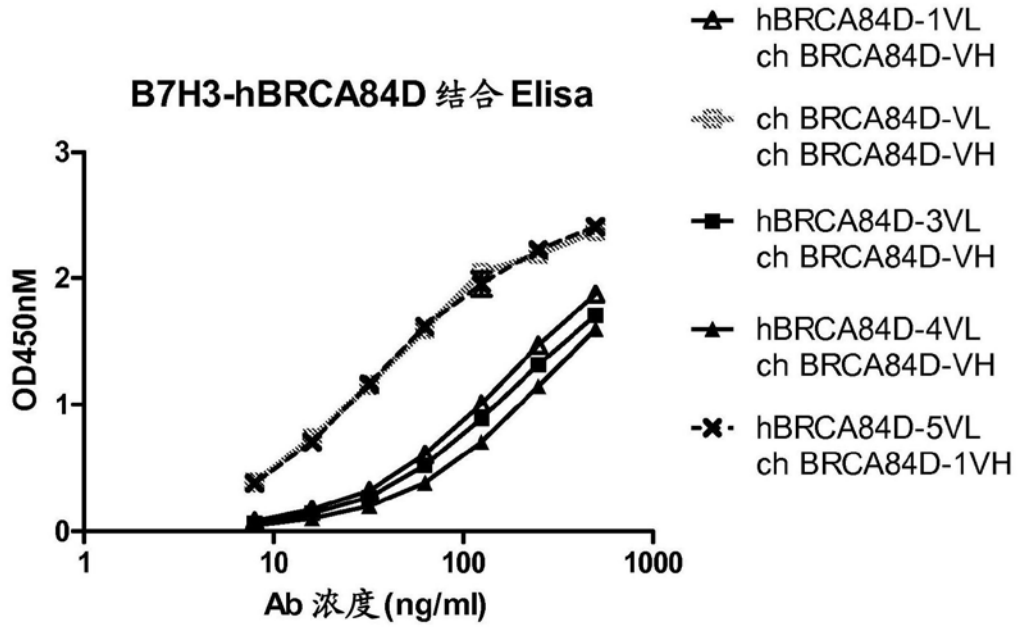

B7H3-hBRCA84D 结合 Elisa
OD450nM
Ab 浓度(ng/ml)
hBRCA84D-1VL
ch BRCA84D-VH
ch BRCA84D-VL
ch BRCA84D-VH
hBRCA84D-3VL
ch BRCA84D-VH
hBRCA84D-4VL
ch BRCA84D-VH
hBRCA84D-5VL
ch BRCA84D-1VH

图12

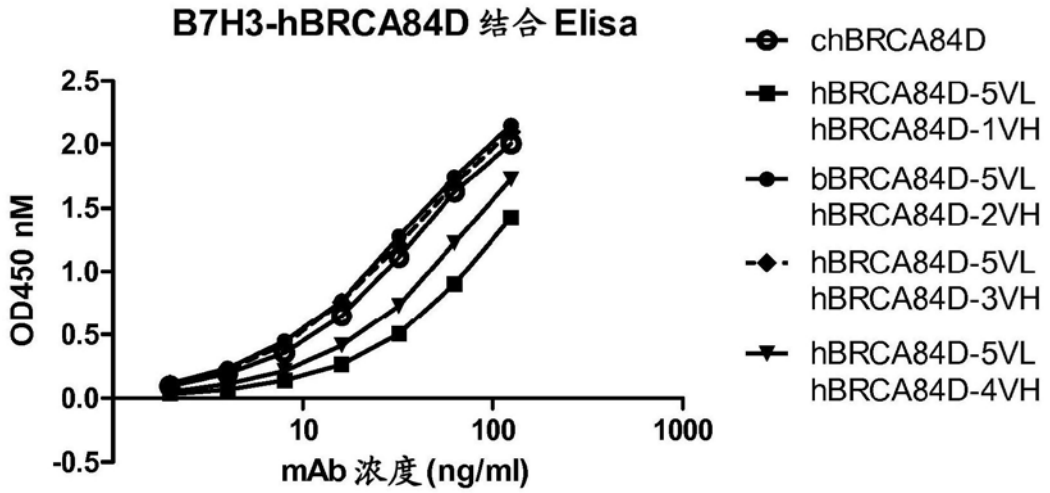

B7H3-hBRCA84D 结合 Elisa
OD450 nM
mAb 浓度(ng/ml)
chBRCA84D
hBRCA84D-5VL
hBRCA84D-1VH
bBRCA84D-5VL
hBRCA84D-2VH
hBRCA84D-5VL
hBRCA84D-3VH
hBRCA84D-5VL
hBRCA84D-4VH

图13

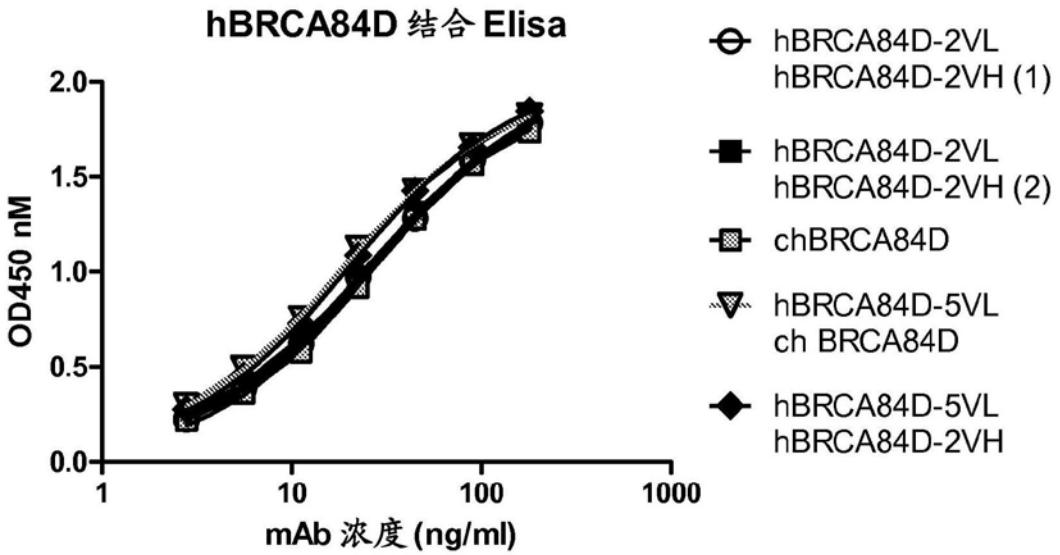

hBRCA84D 结合 Elisa
OD450 nM
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
mAb 浓度 (ng/ml)
hBRCA84D-2VL
hBRCA84D-2VH (1)
hBRCA84D-2VL
hBRCA84D-2VH (2)
chBRCA84D
hBRCA84D-5VL
ch BRCA84D
hBRCA84D-5VL
hBRCA84D-2VH

图14

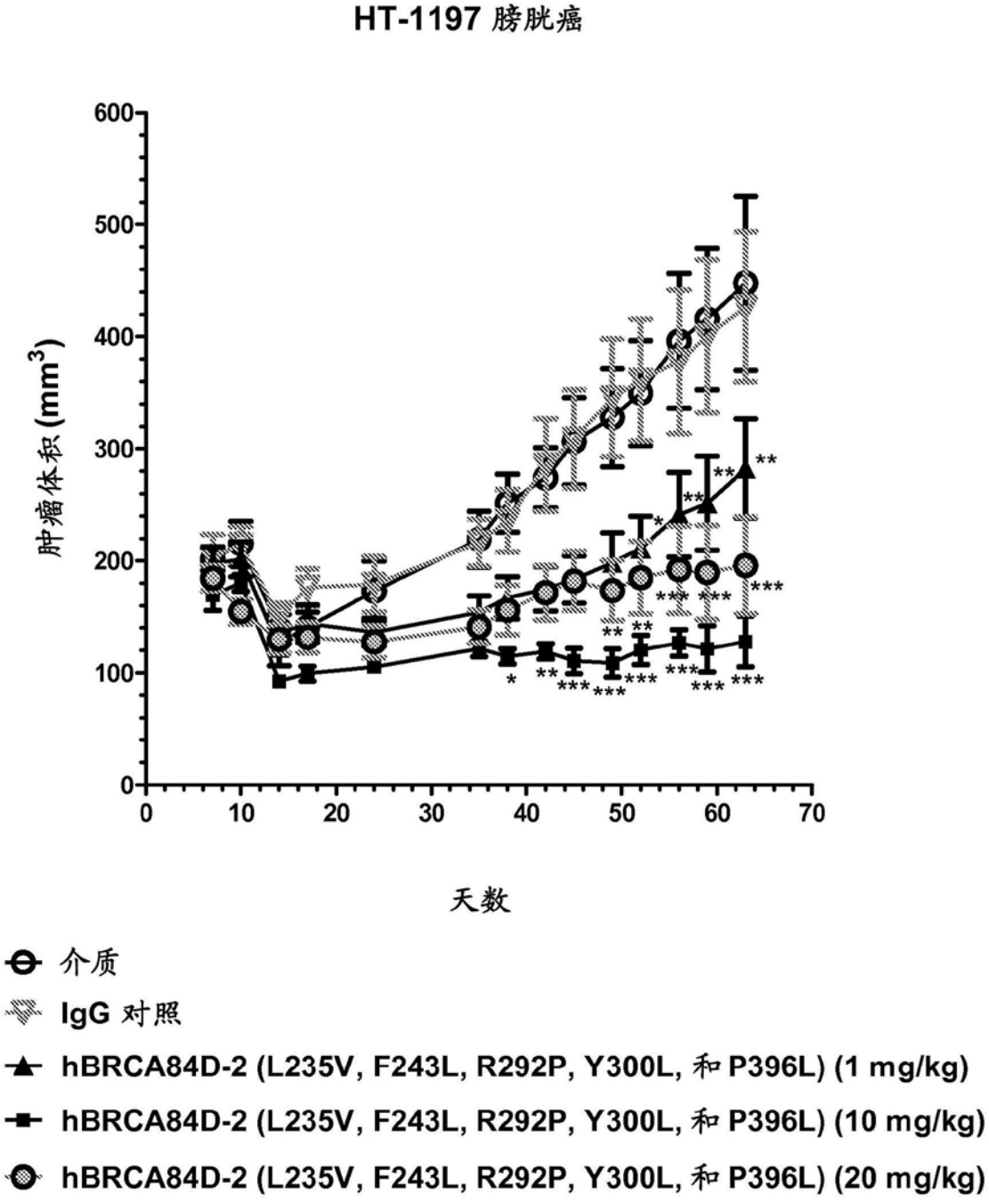

HT-1197 膀胱癌
肿瘤体积 (mm3)
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
70
天数
介质
IgG 对照
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L) (1 mg/kg)
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L) (10 mg/kg)
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L) (20 mg/kg)

图15

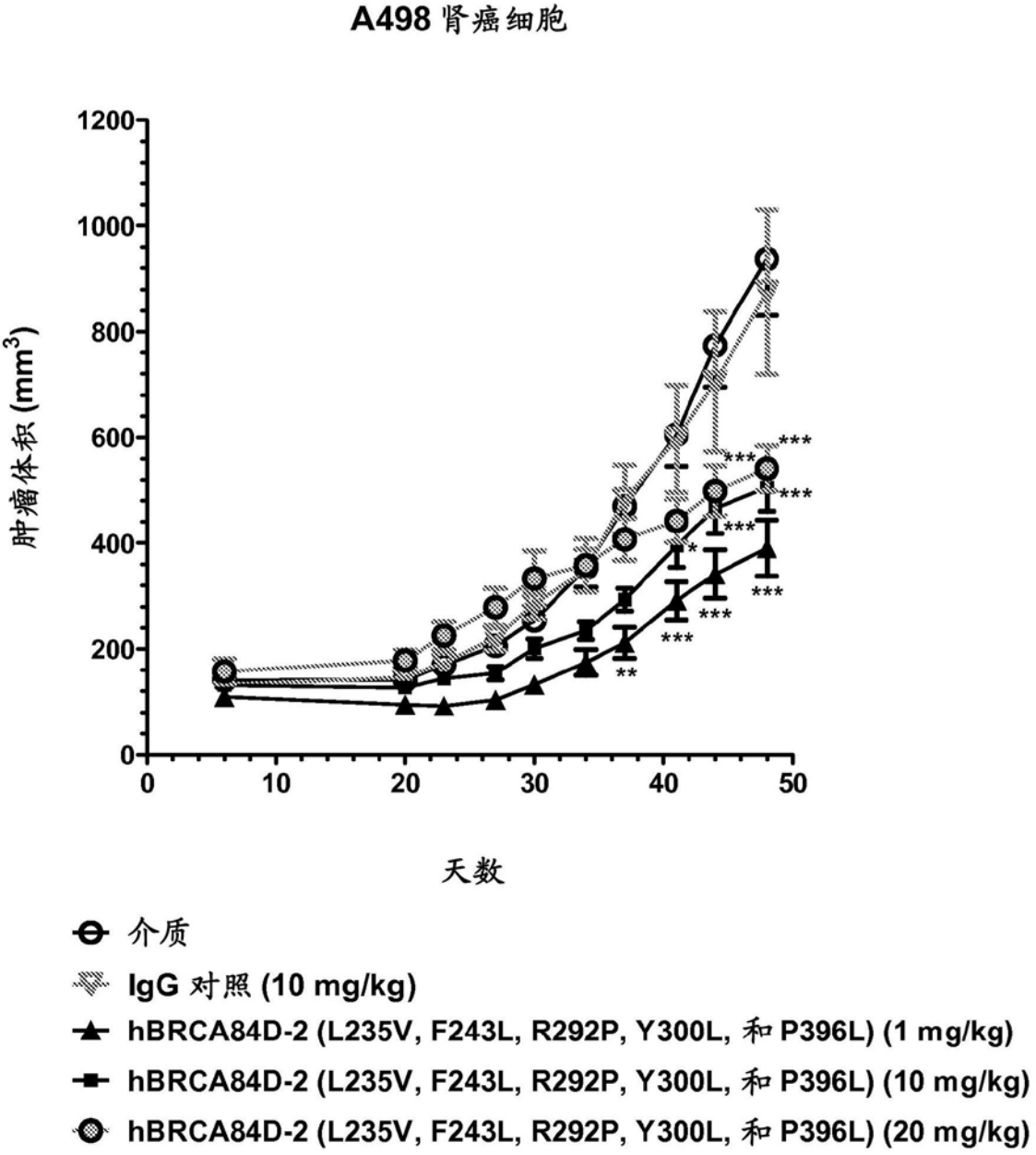

A498 肾癌细胞
肿瘤体积 (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
天数
介质
IgG 对照 (10 mg/kg)
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L) (1 mg/kg)
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L) (10 mg/kg)
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L) (20 mg/kg)

图16

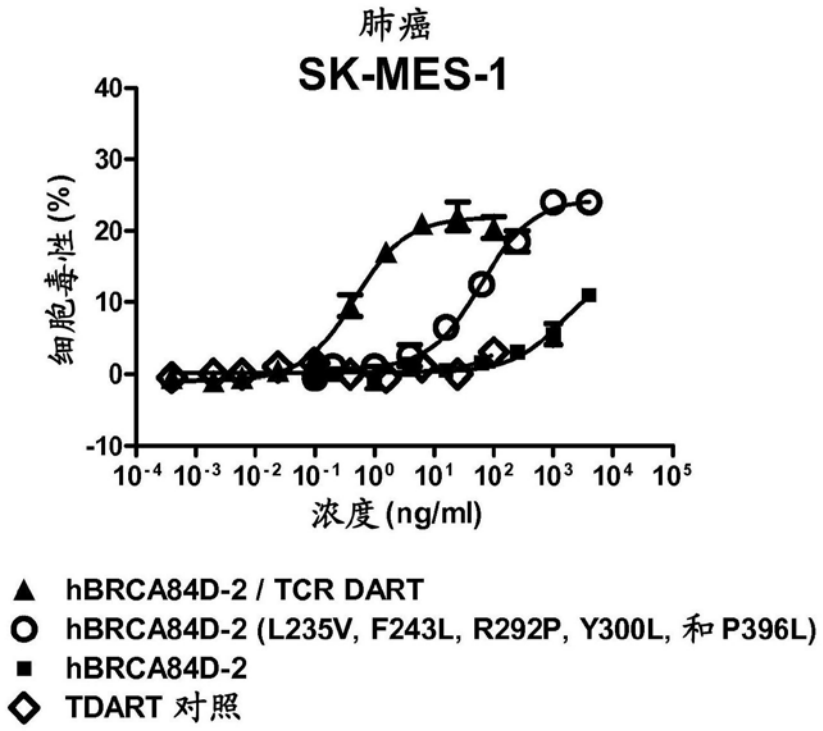

肺癌
SK-MES-1
细胞毒性(%)
40
30
20
10
0
-10
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
浓度(ng/ml)
hBRCA84D-2 / TCR DART
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L)
hBRCA84D-2
TDART 对照

图17A

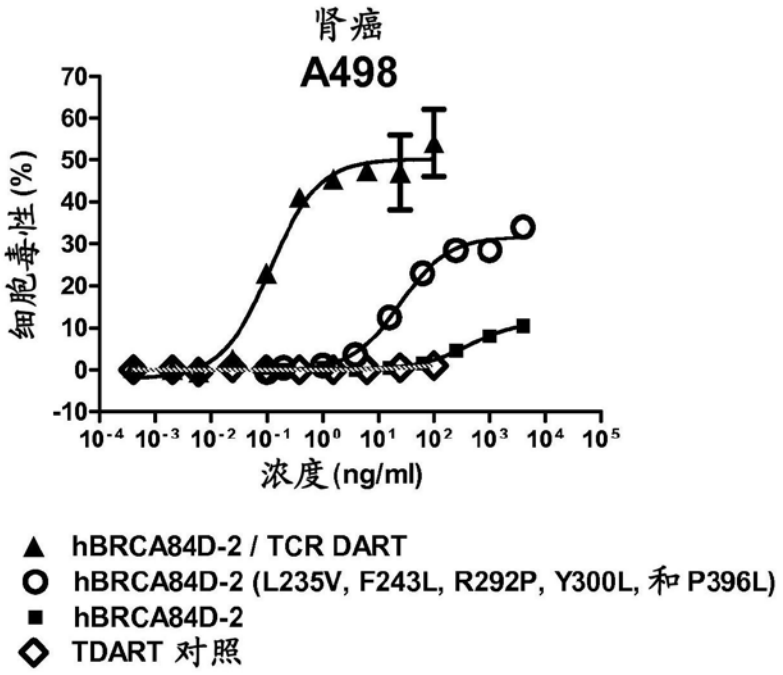

肾癌
A498
细胞毒性(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
浓度(ng/ml)
hBRCA84D-2 / TCR DART
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L)
hBRCA84D-2
TDART 对照

图17B

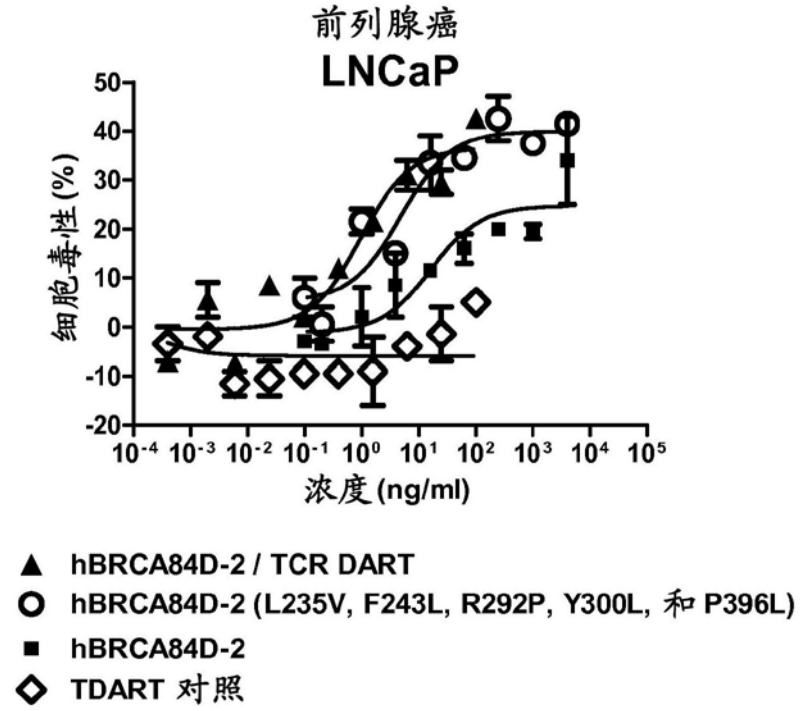

前列腺癌
LNCaP
细胞毒性(%)
50
40
30
20
10
0
-10
-20
10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104 105
浓度(ng/ml)
hBRCA84D-2 / TCR DART
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L)
hBRCA84D-2
TDART 对照

图17C

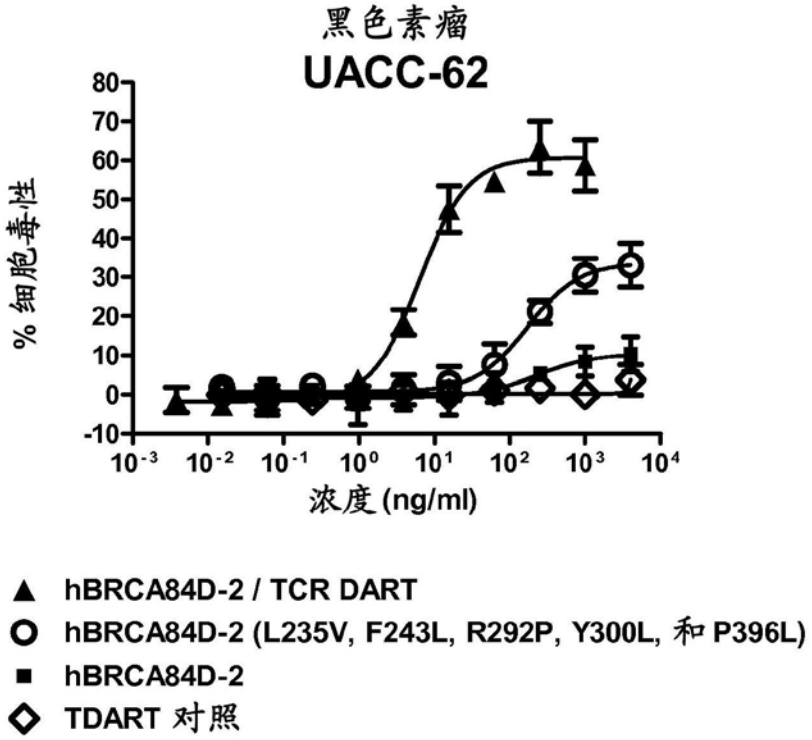

黑色素瘤
UACC-62
% 细胞毒性
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
浓度(ng/ml)
hBRCA84D-2 / TCR DART
hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, 和 P396L)
hBRCA84D-2
TDART 对照

图17D

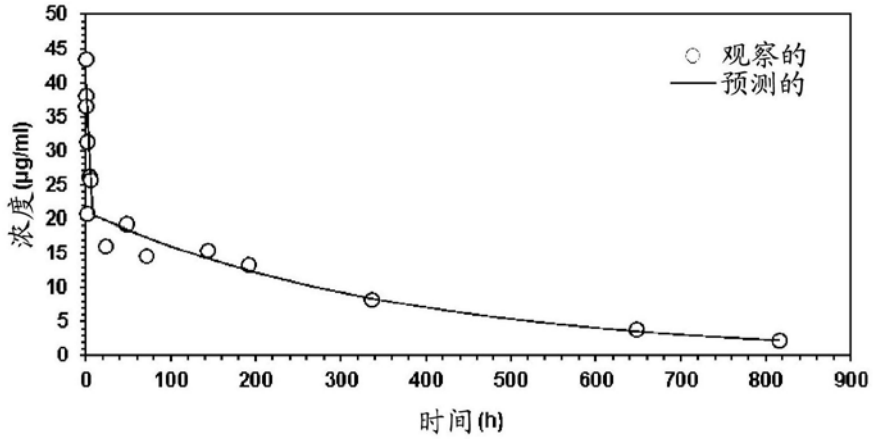

观察的
预测的
浓度(μg/ml)
时间(h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900

图18A

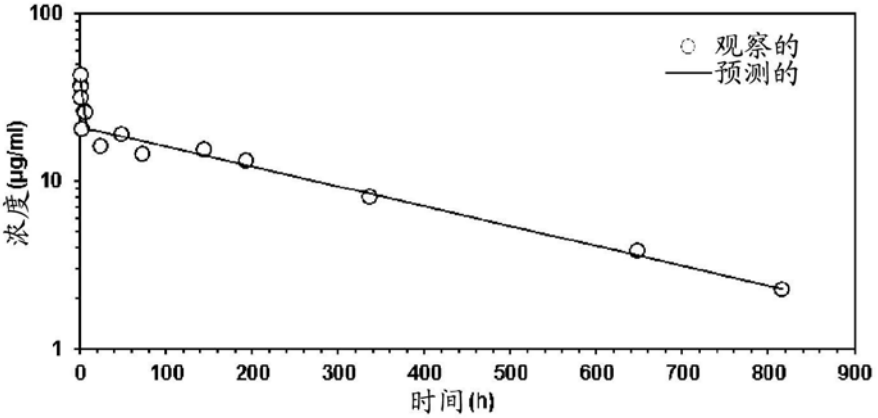

观察的
预测的
浓度(μg/ml)
时间(h)
1
10
100
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900

图18B

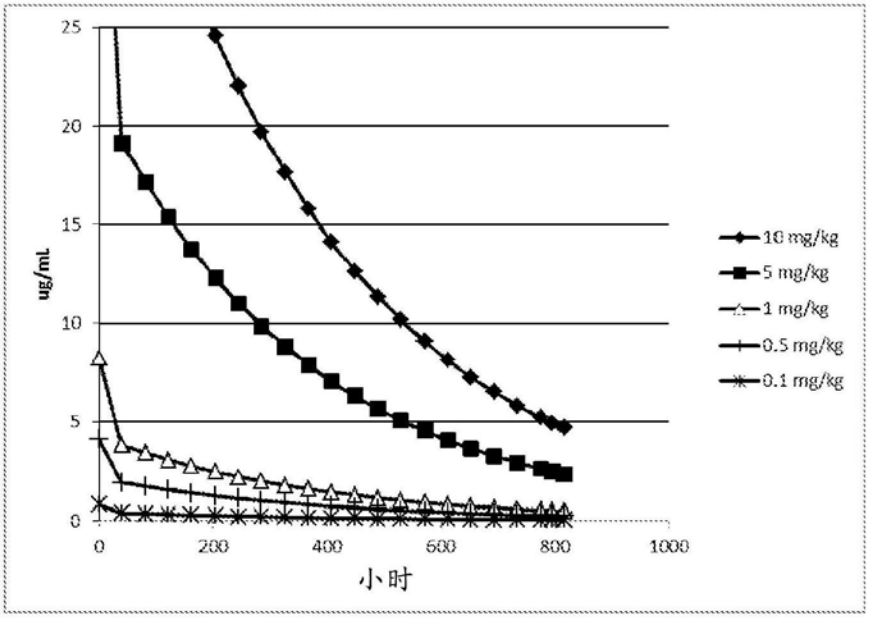

25
20
15
10
5
0
ug/mL
0
200
400
600
800
1000
小时
10 mg/kg
5 mg/kg
1 mg/kg
0.5 mg/kg
0.1 mg/kg

图18C

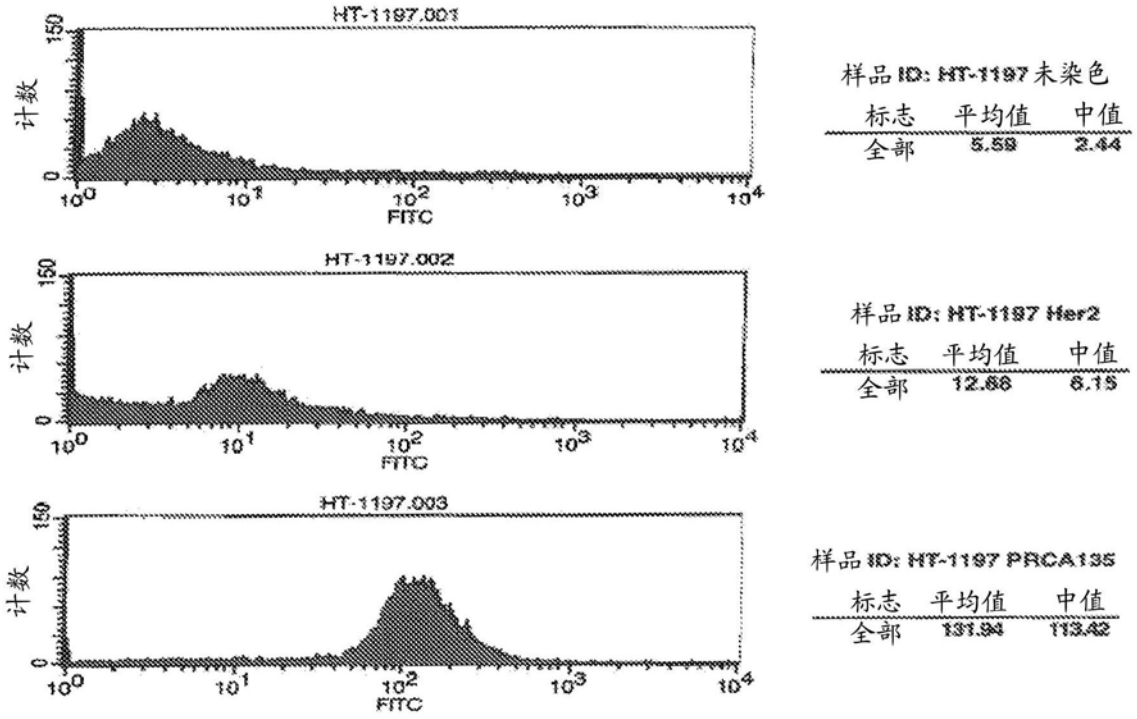

HT-1197.001
计数
FITC
样品 ID: HT-1197 未染色
标志 平均值 中值
全部 5.59 2.44
HT-1197.002
计数
FITC
样品 ID: HT-1197 Her2
标志 平均值 中值
全部 12.88 8.15
HT-1197.003
计数
FITC
样品 ID: HT-1197 PRCA135
标志 平均值 中值
全部 131.94 113.42

图19

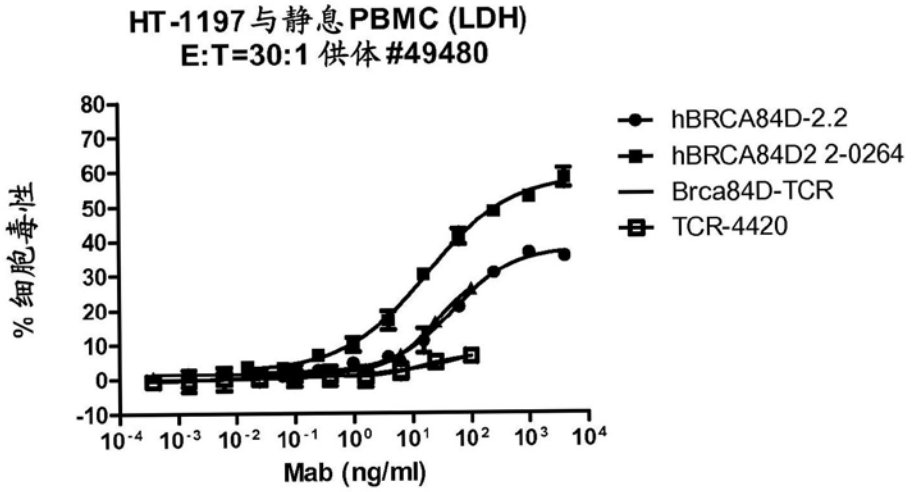

HT-1197与静息PBMC (LDH)
E:T=30:1 供体#49480
% 细胞毒性
Mab (ng/ml)
hBRCA84D-2.2
hBRCA84D2 2-0264
Brca84D-TCR
TCR-4420

图20

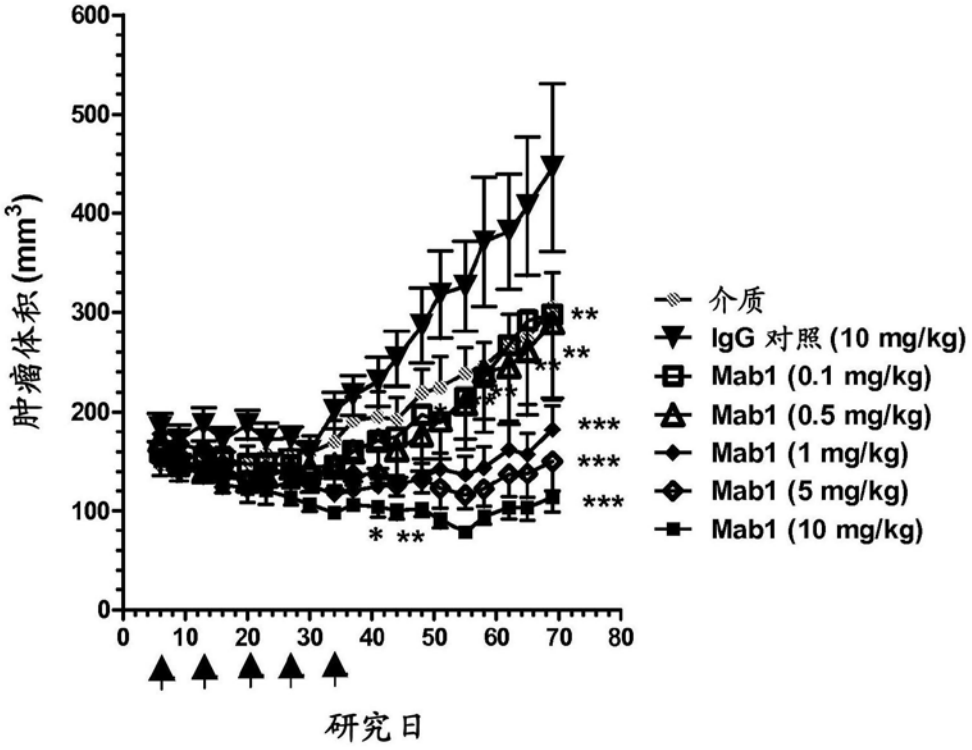

肿瘤体积 (mm3)
研究日
介质
IgG 对照 (10 mg/kg)
Mab1 (0.1 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)

图21A

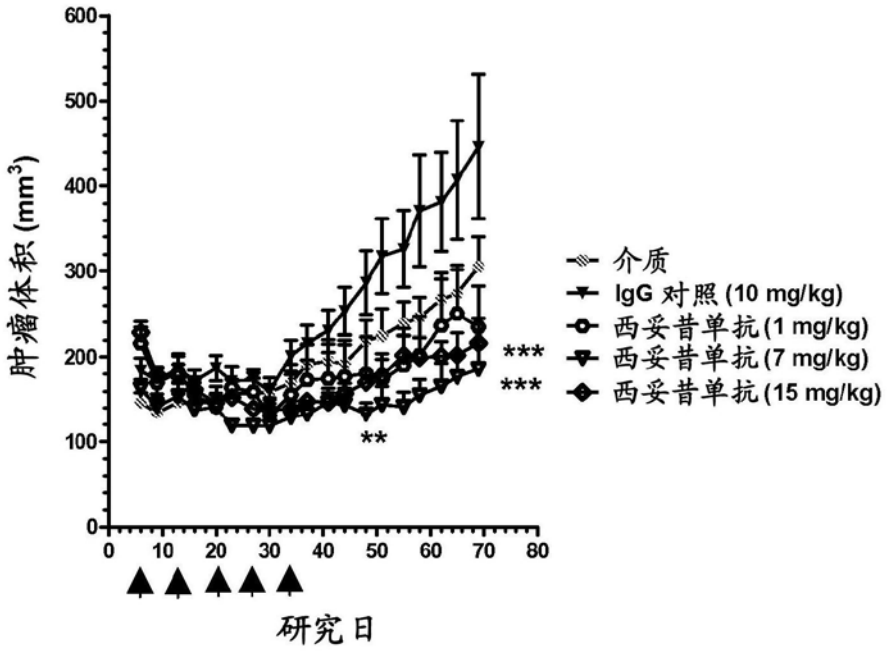

肿瘤体积 (mm3)
600
500
400
300
200
100
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80
研究日
介质
IgG 对照 (10 mg/kg)
西妥昔单抗 (1 mg/kg)
西妥昔单抗 (7 mg/kg)
西妥昔单抗 (15 mg/kg)
***
***
**

图21B

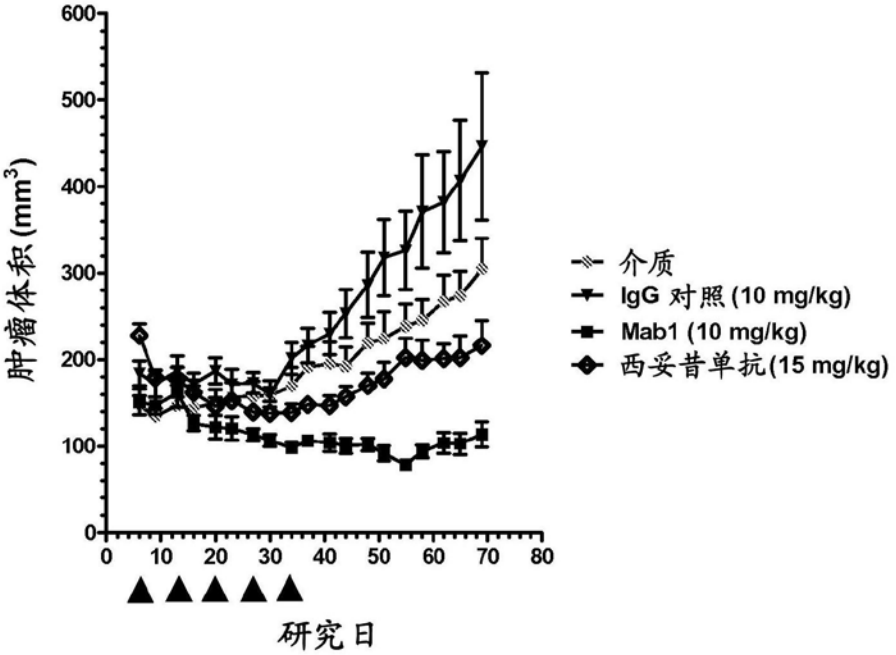

肿瘤体积 (mm3)
600
500
400
300
200
100
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80
研究日
介质
IgG 对照 (10 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
西妥昔单抗 (15 mg/kg)

图21C

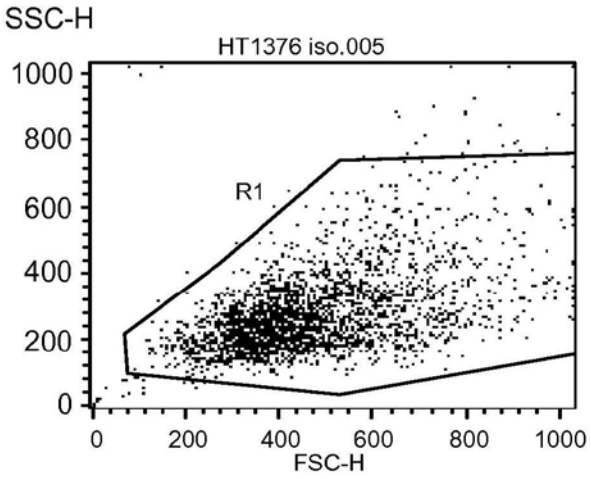

SSC-H
HT1376 iso.005
1000
800
600
400
200
0
R1
0
200
400
600
800
1000
FSC-H

图22A

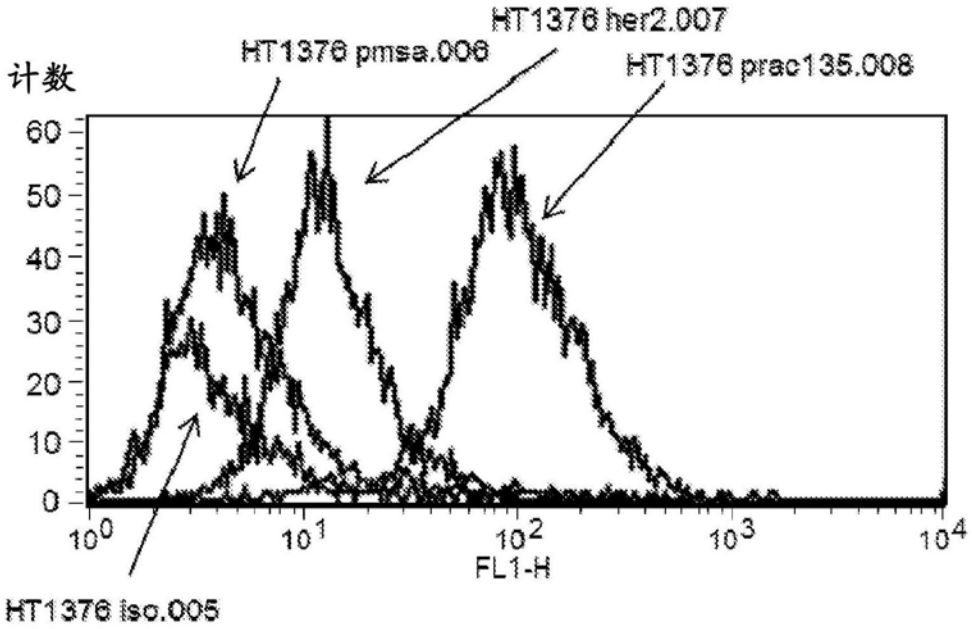

HT1376 her2.007
HT1376 pmsa.006
HT1376 prac135.008
计数
60
50
40
30
20
10
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H
HT1376 iso.005

图22B

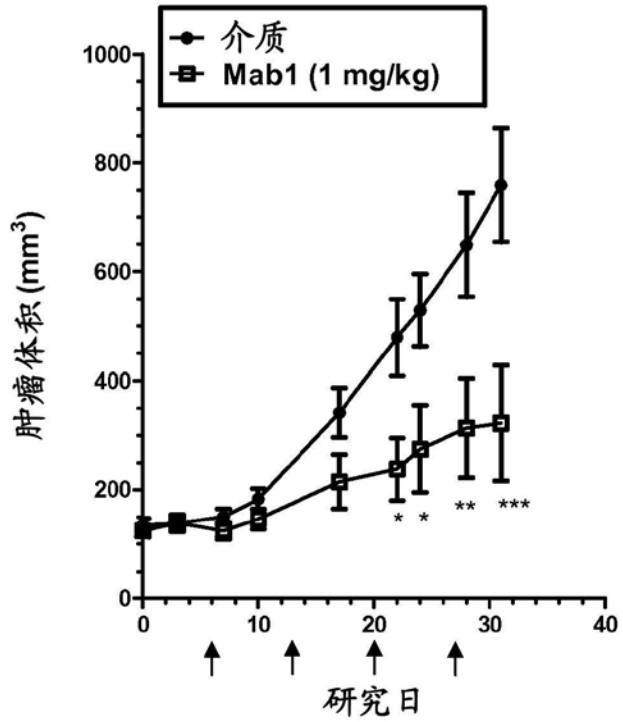

介质
Mab1 (1 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日
0
200
400
600
800
1000
0
10
20
30
40
* *
**
***

图23

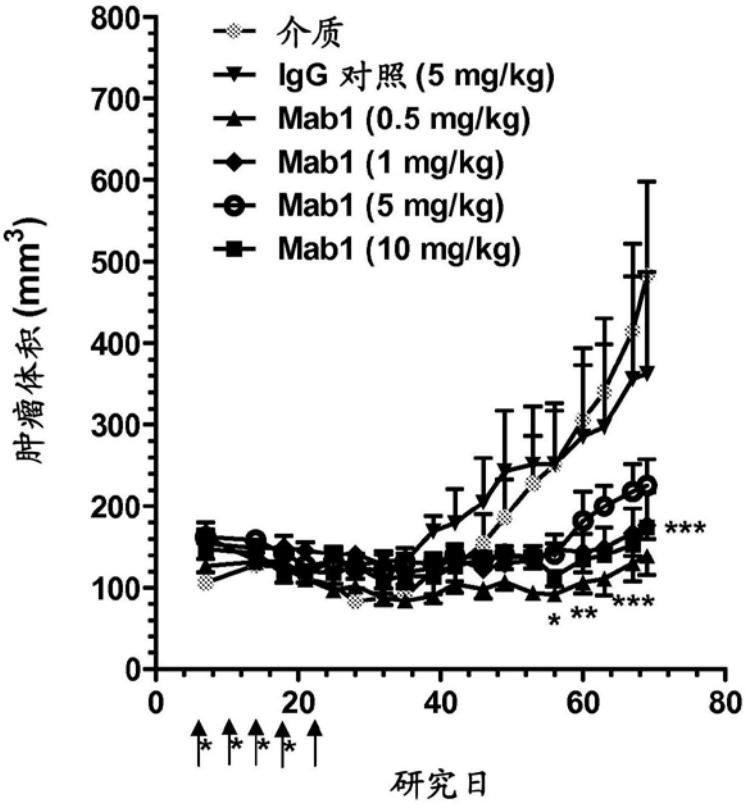

介质
IgG 对照 (5 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日
0
100
200
300
400
500
600
700
800
0
20
40
60
80
* ** ***
***

图24

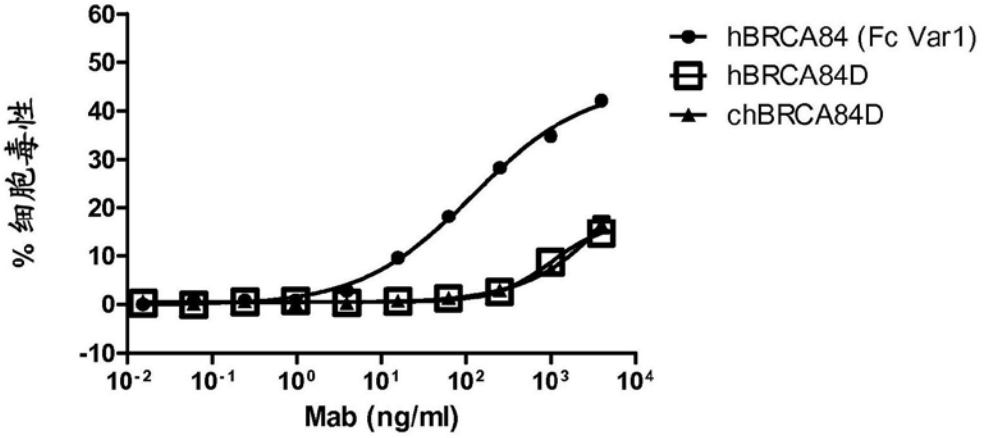

hBRCA84 (Fc Var1)
hBRCA84D
chBRCA84D
% 细胞毒性
Mab (ng/ml)

图25

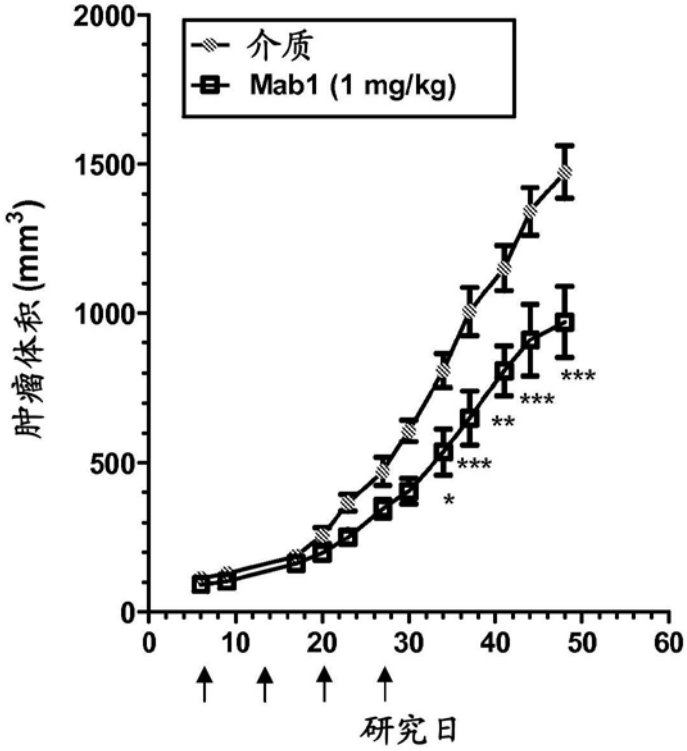

介质
Mab1 (1 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日

图26

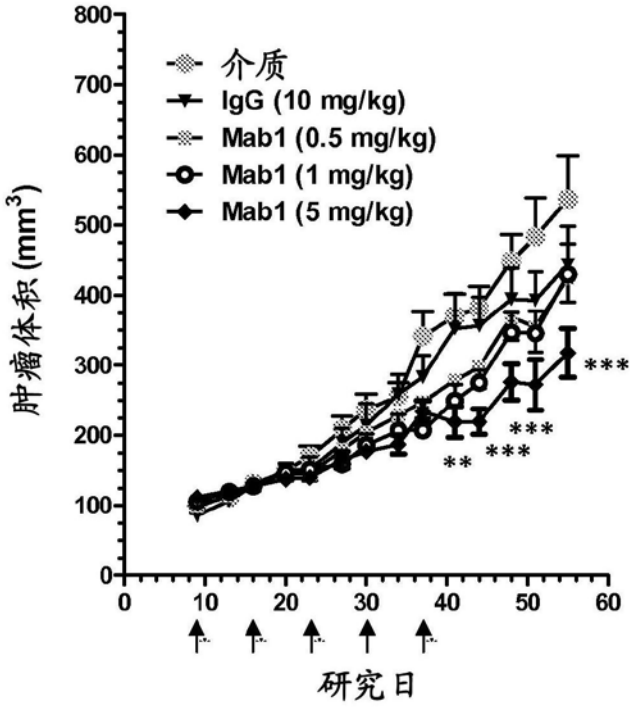

介质
IgG (10 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日
**
***
***
***

图27

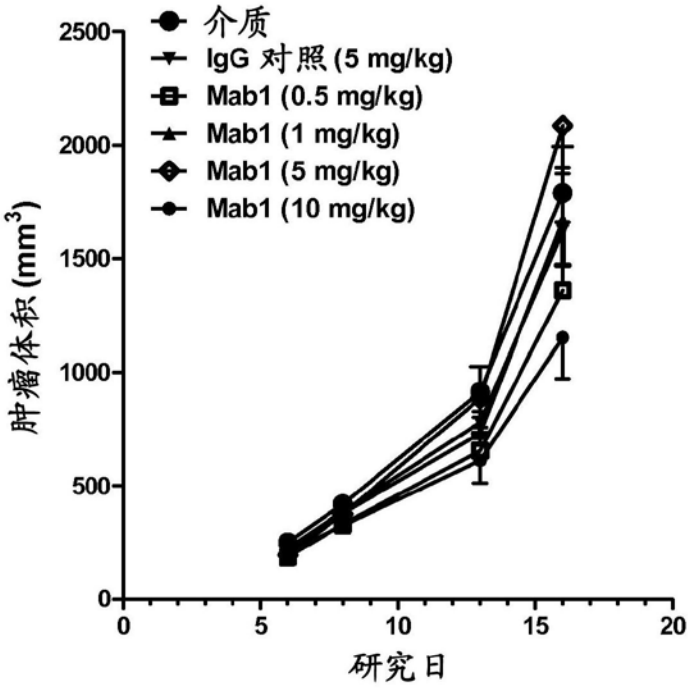

介质
IgG 对照 (5 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日

图28A

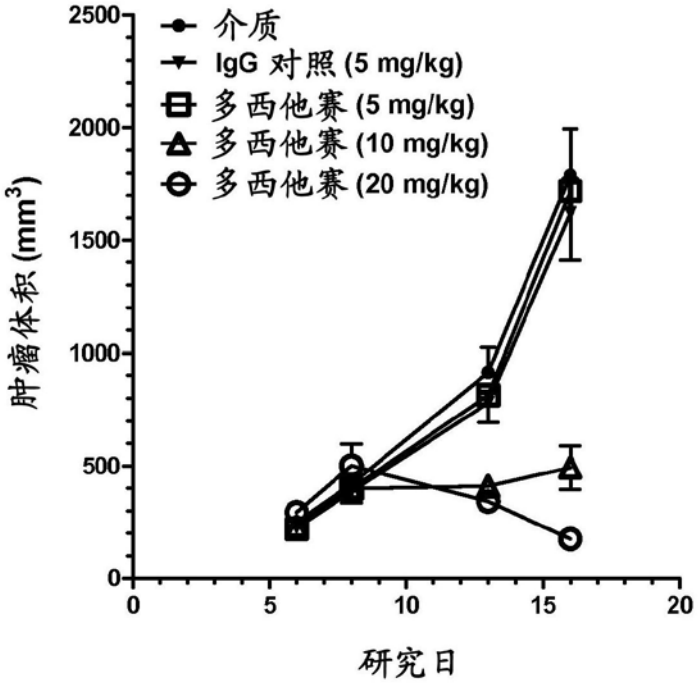

介质
IgG 对照 (5 mg/kg)
多西他赛 (5 mg/kg)
多西他赛 (10 mg/kg)
多西他赛 (20 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日
0
500
1000
1500
2000
2500
0
5
10
15
20

图28B

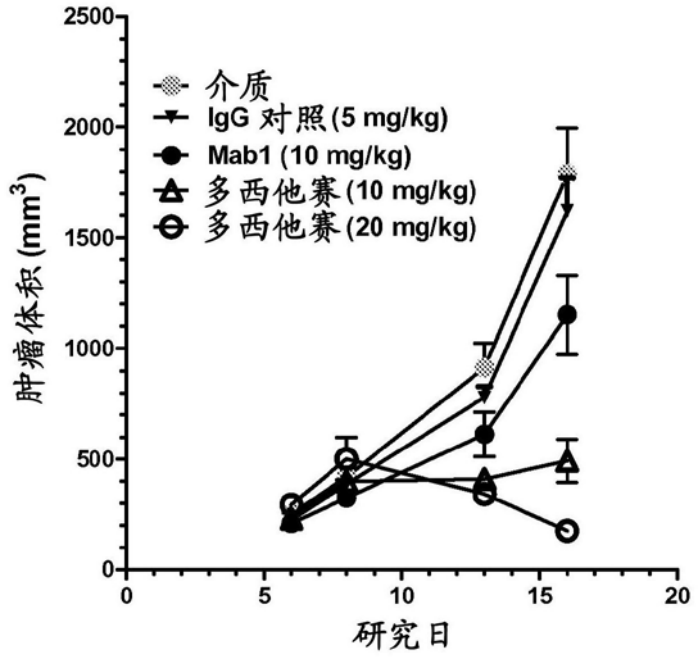

介质
IgG 对照 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
多西他赛 (10 mg/kg)
多西他赛 (20 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日
0
500
1000
1500
2000
2500
0
5
10
15
20

图28C

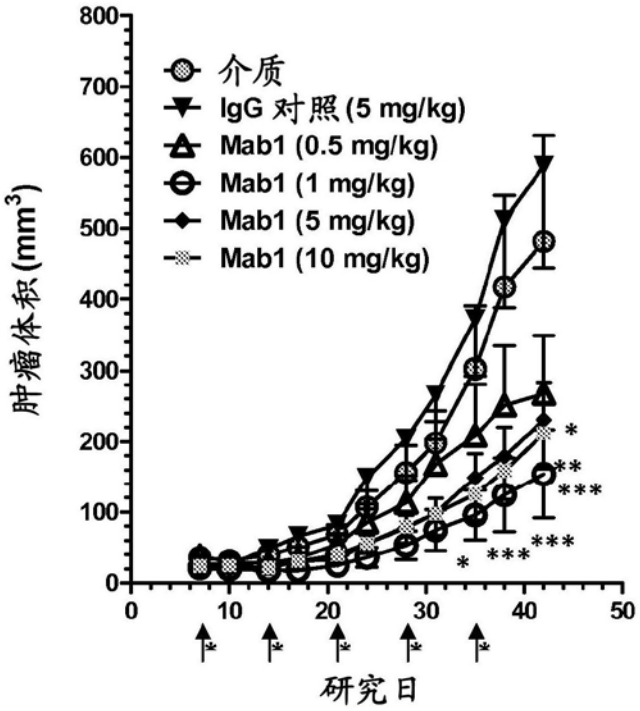

介质
IgG 对照 (5 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日

图29

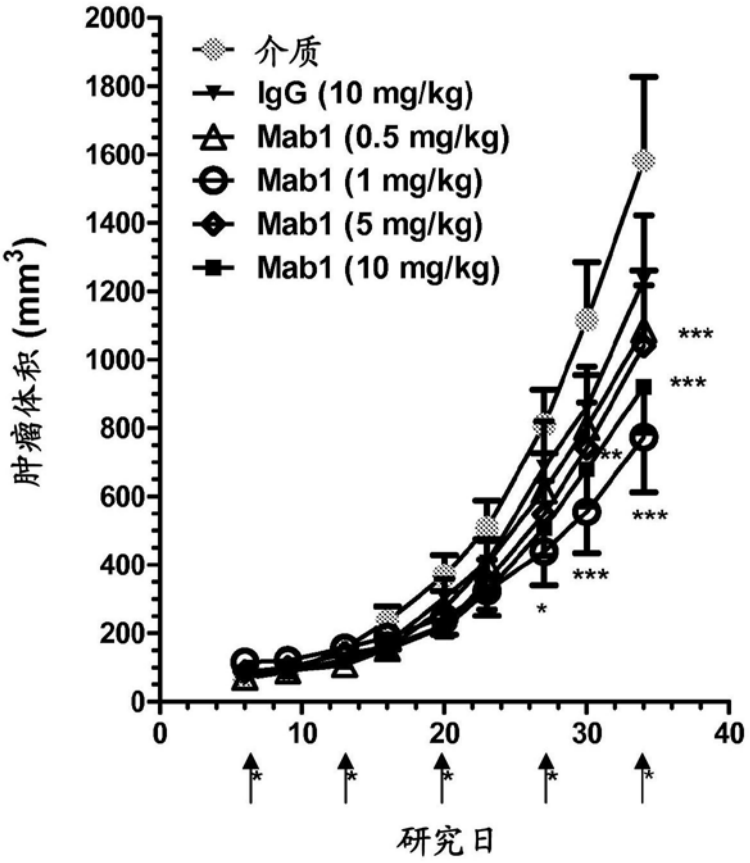

介质
IgG (10 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日

图30A

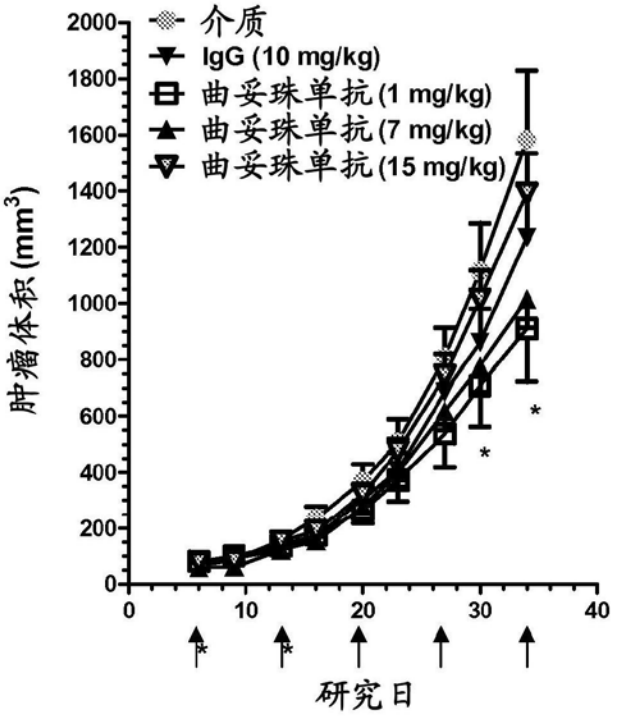

介质
IgG (10 mg/kg)
曲妥珠单抗(1 mg/kg)
曲妥珠单抗(7 mg/kg)
曲妥珠单抗(15 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日

图30B

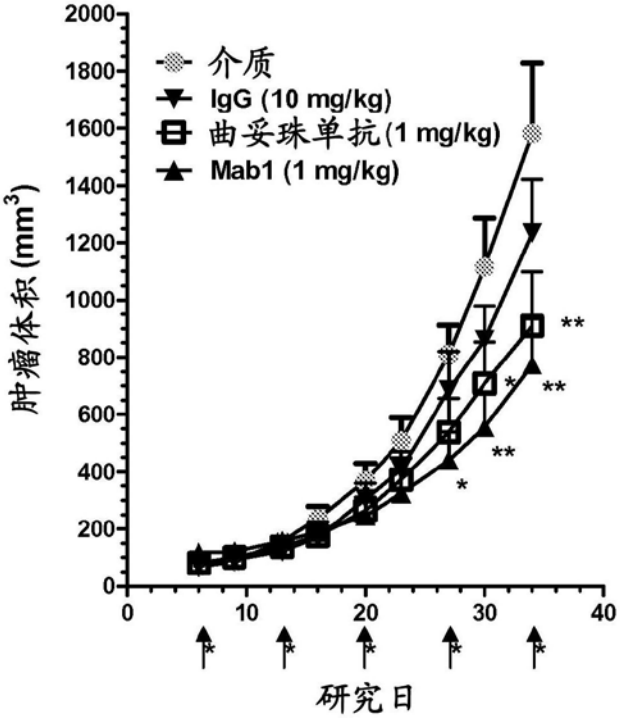

介质
IgG (10 mg/kg)
曲妥珠单抗(1 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
研究日

图30C

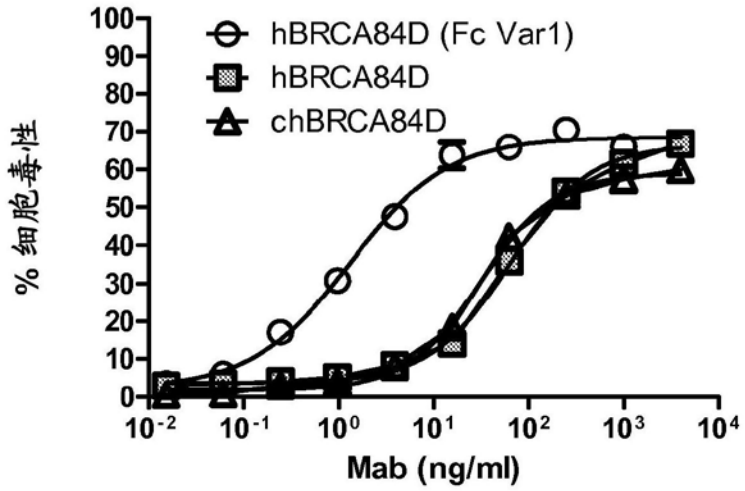

hBRCA84D (Fc Var1)
hBRCA84D
chBRCA84D
% 细胞毒性
Mab (ng/ml)

图31

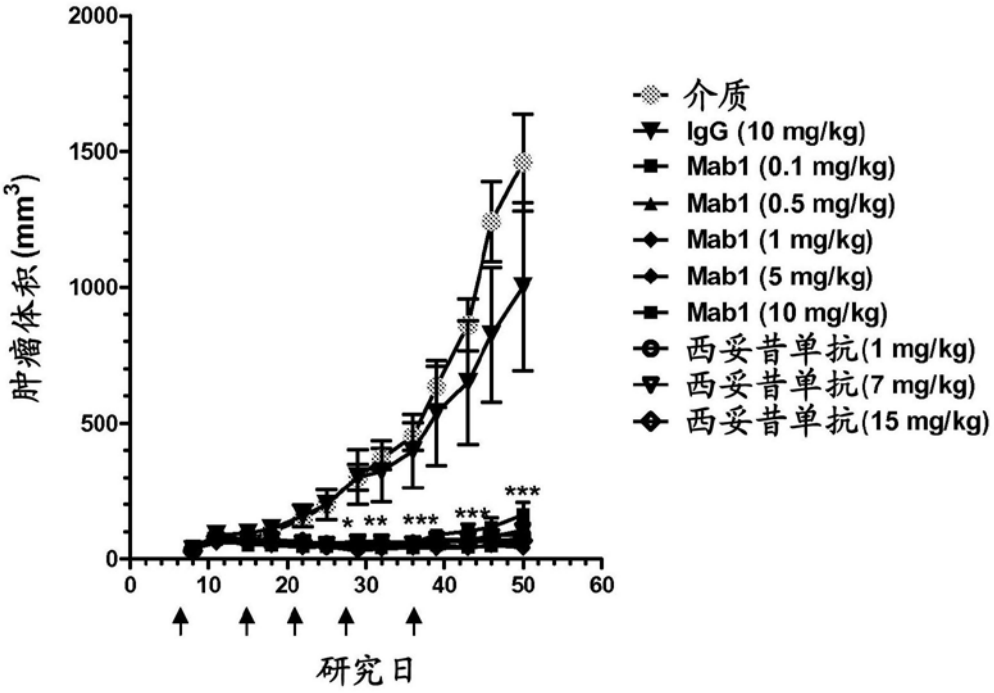

肿瘤体积 (mm3)
研究日
介质
IgG (10 mg/kg)
Mab1 (0.1 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
西妥昔单抗(1 mg/kg)
西妥昔单抗(7 mg/kg)
西妥昔单抗(15 mg/kg)

图32

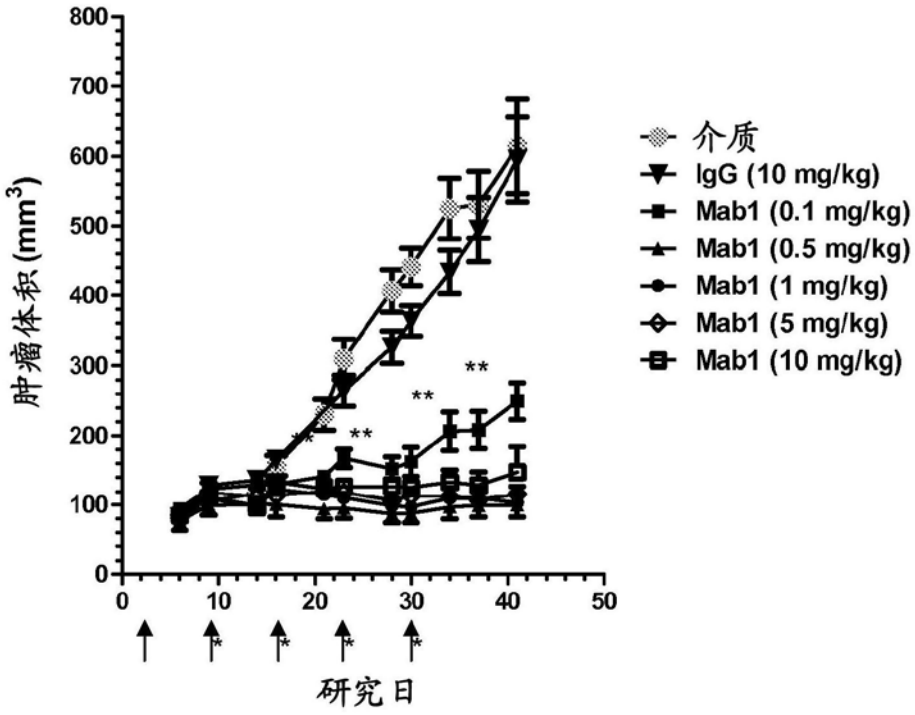

肿瘤体积 (mm3)
研究日
介质
IgG (10 mg/kg)
Mab1 (0.1 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)

图33A

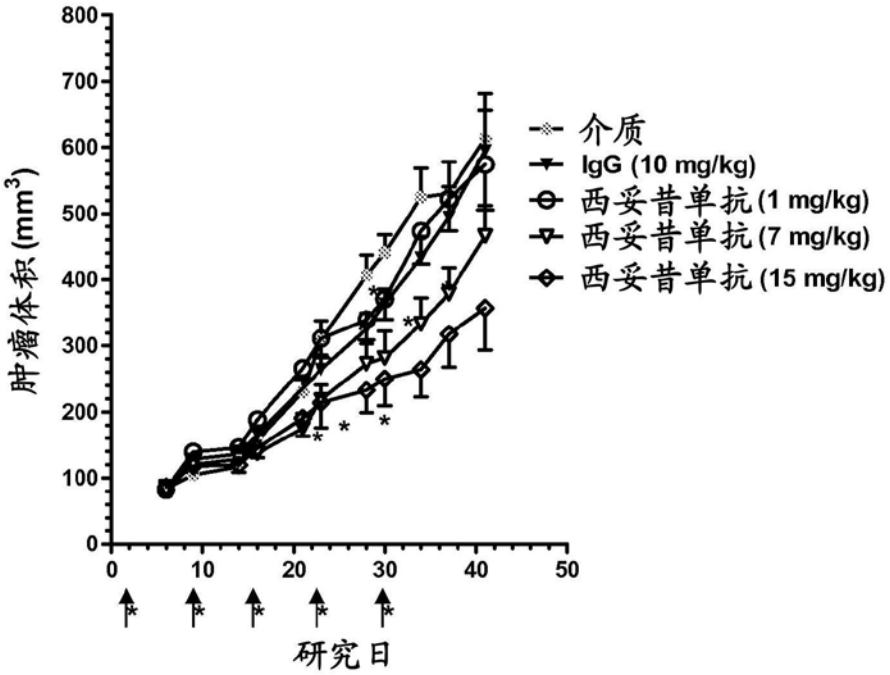

肿瘤体积 (mm3)
研究日
介质
IgG (10 mg/kg)
西妥昔单抗 (1 mg/kg)
西妥昔单抗 (7 mg/kg)
西妥昔单抗 (15 mg/kg)

图33B

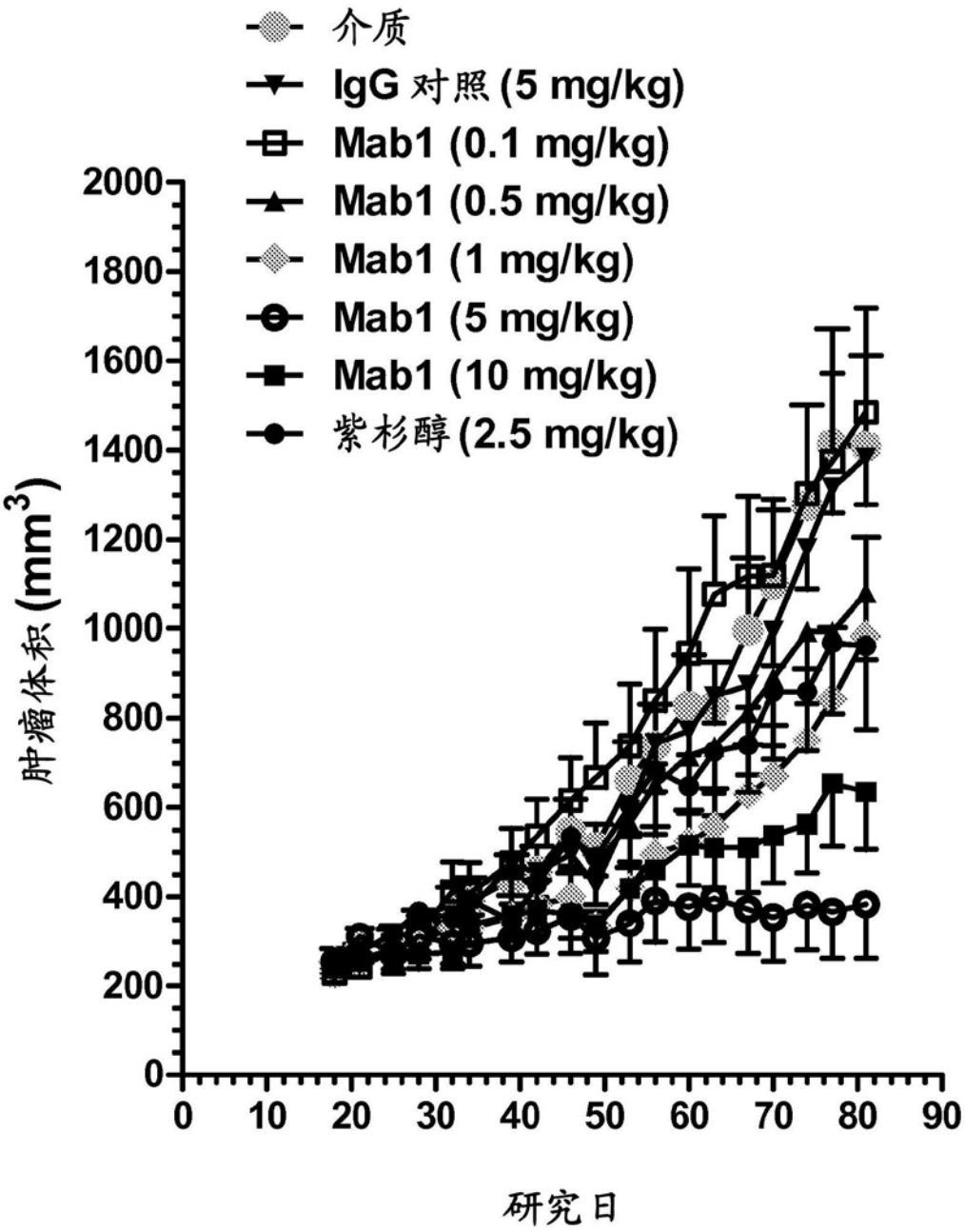

介质
IgG 对照 (5 mg/kg)
Mab1 (0.1 mg/kg)
Mab1 (0.5 mg/kg)
Mab1 (1 mg/kg)
Mab1 (5 mg/kg)
Mab1 (10 mg/kg)
紫杉醇 (2.5 mg/kg)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
研究日

图34